

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-522599

(P2001-522599A)

(43) 公表日 平成13年11月20日 (2001. 11. 20)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーマコード* (参考) |
|---------------------------|-------|----------------------------|--------------|
| C 1 2 N 15/09 | | A 6 1 K 39/29 | |
| A 6 1 K 39/29 | | C 0 7 K 14/18 | Z N A |
| C 0 7 K 14/18 | Z N A | C 1 2 P 21/08 | |
| C 1 2 P 21/08 | | G 0 1 N 33/576 | Z |
| G 0 1 N 33/576 | | C 1 2 N 15/00 | A |
| | | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 59 頁) | |

(21) 出願番号 特願2000-520474(P2000-520474)
 (86) (22) 出願日 平成10年11月6日 (1998. 11. 6)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年5月1日 (2000. 5. 1)
 (86) 国際出願番号 P C T / E P 9 8 / 0 7 1 0 5
 (87) 国際公開番号 W O 9 9 / 2 4 4 6 6
 (87) 国際公開日 平成11年5月20日 (1999. 5. 20)
 (31) 優先権主張番号 9 7 8 7 0 1 7 9 . 5
 (32) 優先日 平成9年11月6日 (1997. 11. 6)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (E P)

(71) 出願人 イノジェネティックス・ナムローゼ・フェンノートシャップ
 I N N O G E N E T I C S N . V .
 ベルギー、ペー-9052ヘント、テヒノロギ-バルク6番
 (72) 発明者 ヘールト・メールテンス
 ベルギー、ペー-8310ブルッヘ、ジルファ-ースパレンストラート64番
 (72) 発明者 エリック・デブラ
 ベルギー、ペー-9070デステルベルヘン、ブルフストラート58番
 (74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断用及びワクチン用、C型肝炎ウイルスエンベロープタンパク質由来マルチマーペプチド

(57) 【要約】

患者の血清中に存在する大多数の抗-H C V抗体と反応するC型肝炎ウイルスエンベロープタンパク質由来のマルチマーペプチド(例えば、30-から45-マーペプチド)が記載されている。C型肝炎ウイルス感染の診断、及び、感染に対するワクチン注射における、後のペプチドの用法についても記載する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗-HCV-関連ウイルス抗体に結合し、それを認識する、HCV-関連ウイルスのエンベロープ領域由来の20を超える連続したアミノ酸からなるペプチド。

【請求項2】 体液試料中に存在する抗-HCV抗体、または、抗-HGV抗体に結合し、それを認識するペプチドであって、配列番号1~38に表される配列からなる群から選択されるペプチド。

【請求項3】 請求項2に記載のペプチドの機能的に均等なバリエーションまたは断片。

【請求項4】 該体液試料中に存在する抗-HCV抗体が、抗-HCV-E1若しくは抗-HCV-E2抗体である、請求項2または3に記載のペプチド。

【請求項5】 該体液試料中に存在する抗-HGV抗体が、抗-HGV-E1若しくは抗-HGV-E2抗体である、請求項2または3に記載のペプチド。

【請求項6】 ペプチドが化学的に合成されたものである、請求項1~5のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項7】 ペプチドが組換えDNA技術を用いて合成されたものである、請求項1~5のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項8】 該ペプチドがビオチニル化、または、システイン架橋を含む、請求項1~7のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項9】 請求項1~8のいずれか1項に記載のペプチドの組合せ。

【請求項10】 HCV-関連ウイルスに対する曝露または感染を診断する方法であって：

- (1) 体液試料中の抗-HCV-関連ウイルス抗体を請求項1~8のいずれか1項に記載のペプチド、または、請求項9に記載のペプチドの組合せと接触させること、
 - (2) 体液試料中の抗-HCV-関連ウイルス抗体と請求項1~8のいずれか1項に記載のペプチド、または、請求項9に記載のペプチドの組合せとの結合を測定すること、
- を含む方法。

【請求項11】 体液試料中の抗-HCV-関連ウイルス抗体の存在を検出するための分析用キットであり：

- (1)場合により固体担体、
- (2)請求項1～8のいずれか1項に記載のペプチド、または、請求項9に記載のペプチドの組合せ、
- (3)体液試料中の抗-HCV-関連ウイルス抗体と、請求項1～8のいずれか1項に記載のペプチド、または、請求項9に記載のペプチドの組合せとの間に形成された複合体を測定可能にする、適当なマーカー、を含むキット。

【請求項12】 ペプチドと抗-HCV-関連ウイルス抗体の間の相互作用を調節する化合物を同定する生物学的検定法であって：

- (1)抗-HCV-関連ウイルス抗体を請求項1～8のいずれか1項に記載のペプチド、または、請求項9に記載のペプチドの組合せと接触させること、
 - (2)抗-HCV-関連ウイルス抗体と請求項1～8のいずれか1項に記載のペプチド、または、請求項9に記載のペプチドの組合せとの結合を測定すること、
 - (3)接触させた抗-HCV-関連ウイルス抗体、及び、請求項1～8のいずれか1項に記載のペプチドまたは請求項9に記載のペプチドの組合せに、モジュレーター、または、モジュレーターの組み合わせを添加すること、
 - (4)抗-HCV-関連ウイルス抗体を請求項1～8のいずれか1項に記載のペプチド、または、請求項9に記載のペプチドの組合せとの結合の変化を測定すること、
- を含む生物学的検定法。

【請求項13】 ペプチドと抗-HCV-関連ウイルス抗体の間の相互作用を調節する化合物を同定する生物学的検定法であって：

- (1)抗-HCV-関連ウイルス抗体と請求項1～8のいずれか1項に記載のペプチド、または、請求項9に記載のペプチドの組合せとの結合

を測定すること、

(2)モジュレーターを、請求項1～8のいずれか1項に記載のペプチド、または、請求項9に記載のペプチドの組合せに接触させること、

(3)請求項1～8のいずれか1項に記載のペプチド、または、請求項9に記載のペプチドの組合せに接触させたモジュレーターに、抗-HCV-関連ウイルス抗体を添加すること、

(4)抗-HCV-関連ウイルス抗体の請求項1～8のいずれか1項に記載のペプチド、または、請求項9に記載のペプチドの組合せとの結合の変化を測定すること、

を含む生物学的検定法。

【請求項14】 請求項12または13に定義されるようにモジュレーターを製造する方法。

【請求項15】 ペプチドと抗-HCV-関連ウイルス抗体の間の相互作用のためのモジュレーターであって、請求項12または13に記載の方法により同定されたモジュレーター。

【請求項16】 モジュレーターまたはモジュレーターの組合わせを含む組成物であって、該モジュレーターまたはモジュレーターの組合せが請求項12または13に記載の方法によって同定された組成物。

【請求項17】 請求項1～8のいずれか1項に記載のペプチド、または、請求項9に記載のペプチドの組合せを含む組成物。

【請求項18】 転写調節エレメントと作動可能に連結させた、請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチド、または、請求項12～16のいずれか1項に記載のモジュレーターをコードする核酸配列を含むプラスミドベクター。

【請求項19】 請求項16～18のいずれか1項に記載の組成物であって、HCV-関連ウイルス、または、そのあらゆる変異株による感染に対するワクチンとしてヒトに用いるための組成物。

【請求項20】 請求項16～18のいずれか1項に記載の組成物であって、HCV-関連ウイルス、または、そのあらゆる変異株による感染に対して、ヒトを治療的に処置するための組成物。

【請求項21】 抗体、特にモノクローナル抗体であって、請求項1～9のいずれか1項に記載のHCV-関連ウイルスペプチドを特異的に認識することによって特徴付けられる抗体。

【請求項22】 HCV-関連ウイルスまたはそのあらゆる変異株による感染に対してヒトを免疫化する方法であって、請求項1～8のいずれか1項に記載のペプチド、または、請求項9に記載のペプチドの組合せを用いることを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、患者の血清中に存在する大多数の抗-HCV-抗体と反応するC型肝炎ウイルスのエンベロープタンパク質由来のマルチマーペプチドに関連する。従って、本発明はC型肝炎ウイルス感染の診断、及び、感染に対してワクチン化する方法における後のペプチドの使用に関連する。

【0002】

背景技術

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は、先進国及び途上国の両方における主要な健康問題である。世界人口の約1~5%が、このウイルスに冒されていると見積もられており、世界中で総計1億7千5百万の慢性感染にのぼる。HCV感染は、輸血関連肝炎の最も有力な原因であり、しばしば慢性肝臓傷害へと進行する。そのうえ、肝細胞性癌の誘発にHCVが関連していることを示す証拠もある。そのため、信頼できる診断方法、及び、有効な治療剤に対する需要は高い。また、C型肝炎に対する有効なワクチンを設計するのに用いることができる新しいエピトープの特性付けに対する差し迫った要望もある。

【0003】

HCVは、9,8キロベースの(+)鎖からなるRNAウイルスであり、少なくとも3つの構造タンパク質及び6つの非構造タンパク質をコードする。構造タンパク質は現在までのところ機能的に示されていないが、1つのコアタンパク質、並びに、2つのエンベロープタンパク質E1及びE2から成ると考えられている。E1タンパク質は192のアミノ酸から成り、HCVの遺伝子型に依存して5~6個のN-グリコシル化部位を含むのに対し、E2タンパク質は、HCV遺伝子型に依存して、363~370のアミノ酸から成り、最大11個までのN-グリコシル化部位を含む(総説についてはMaertens及びStuyver(1997年)参照)。

【0004】

E1及びE2タンパク質は、主として、哺乳動物細胞での発現及び非変性精製技術を必要とするその複雑な形態構造のため、目下のところHCV抗体(Ab)分

析に含まれていない。実際、大腸菌でのE 2発現後、H C V血清の該組換えタンパク質との反応性は、14(Yokosukaら(1992年))から17%(Mitaら(1992年))の範囲にあるのに対し、真核細胞系での発現では、13~97%(Inoue(1992年); Chien(1993年))の反応性を与える。別の研究者らは、真核細胞より単一タンパク質として発現されたE 1タンパク質が、患者の血清と高い反応性示さなかったことを明らかにしている(約6~60%、Koharaら(1992年); Hsuら(1992年); Chienら(1993年))。哺乳動物細胞で発現された精製組換えE 1及びE 2タンパク質の両方に対するA bの高い普及率が、慢性C型肝炎患者の血清で見つかることを以前報告した(WO 96/04385号、Maertensら)。これと関連して、H C V患者の血清中の抗-E 1及び抗-E 2抗体の大多数が、20マー ペプチドを用いてマップできないことも示した(WO 96/04385号、Maertensら)。実際、E 1に対するマウスモノクローナル抗体全てについて、エピトープA(アミノ酸313-326)及びエピトープB(アミノ酸208-224)と表示される、20マー ペプチドに対する反応性がマップされたのに対し、患者の組換えタンパク質と反応性を有する血清の最大50%が、エピトープA及びBを認識した。E 2タンパク質については、20マー ペプチドを用いて、24のマウスモノクローナル抗体中、3つしかマップすることができなかった。これら3つの抗体は、ペプチドE 2-67(アミノ酸394-413)に包含される超可変領域I(H V R I)及び、E 2-13Bと表示されるペプチド(アミノ酸523-542)に包含される領域にマップされた。残りの21個のA bは20マー ペプチドを用いてマップすることができなかった。これらのA bのうち7個の相対的マップ位置は、組換えE 2タンパク質を用いた競合試験により推定することができた。

【0005】

整理すると、抗-E 1及び抗-E 2 A bは、H C V患者の血清中に広く普及しているように思われる。しかしながら、これらのA bの存在を決定することは、厄介な非変性技術により精製する必要がある真核細胞発現E 1及びE 2を用いる必要があるため、問題のあるものである。代替手段として、E 1及び/またはE 2タンパク質由来の、化学合成20マー ペプチドが製造された。しかしながら、これらの合成20マー ペプチドは、H C V患者の血清中の抗-E 1及び抗-E 2 A bを認識することができなかった。

【0006】

従って、HCVエンベロップAbをスクリーニングする代替方法を設計する必要性がある。

【0007】

発明の目的

HCV患者の血清中の抗-E1及び抗-E2Abを認識(及び、それに結合)するのに必須の複雑な形態構造を、E1及びE2タンパク質がおそらく有していることは上述の文献から明らかである。これによって、グリコシル化部位、関連シャペロン若しくは正確なシステイン架橋の欠如のための異常フォールディングされているかもしれない原核細胞で発現された完全な、または、ほぼ完全なE1及びE2タンパク質、並びに、複雑な形態構造を模倣することができない20-マーペプチドが、どうしてこれらのAbを認識できないかが説明され得る。

【0008】

本発明は、マルチマーペプチド(例えば30-~45-マーペプチド)が、HCV患者の血清中の抗-E1及び抗-E2Abの大多数を認識できるという、驚くべき発見に基づく。E1及びE2由来30-~45-マーペプチドが適切にフォールディングされ、HCVエンベロップAbの大多数を効果的に認識することを示唆するものは何もなかったことから、これが驚くべき発見であることは明らかである。逆にマルチマーペプチドの異常フォールディングを起こす可能性が、上で示唆される原核細胞発現完全タンパク質が異常フォールディングを起こす可能性と同じ位、あるいは、それより大きいと一般には仮定されるだろう。例えば、大腸菌から発現され、90%以上の患者試料と反応するHCV NS3タンパク質の場合、20-50マーペプチドは、非常に弱くしか反応しない。

【0009】

ゆえに、本発明は抗-HCV-関連ウイルス抗体に結合し、該抗体を認識するHCV-関連ウイルスのエンベロップ領域由来の20を越える連続アミノ酸からなるペプチドを提供することを目的とする。HCV、GBV-Bウイルス、GBV-Aウイルス及びGBV-C(HGVまたはG型肝炎ウイルス)を含むHCV-関連ウイルスはフラビウイルス科に属し、この科にはデングウイルス、黄熱ウイルス、古

典豚コレラウイルス及びウイルス性ウシ下痢症ウイルス等のペスチウイルスが含まれる(Wengler(1991年))。

【0010】

より明確には、本発明は体液試料中に存在する抗-HCV抗体または抗-HGV抗体に結合し、該抗体を認識し、配列番号1～38(表1参照)に記載の配列からなる群から選択される、または、それらの機能的に均等なバリエーション若しくは断片である、ペプチドを提供することを目的とする。

【0011】

この点で、体液試料中の該抗-HCV抗体が抗-HCV-E1抗体または抗-HCV-E2抗体である上述のペプチドを提供することが、特に本発明の目的である。

【0012】

従ってまた、体液試料中の該抗-HGV抗体が、抗-HGV-E1抗体または抗-HGV-E2抗体である上述のペプチドを提供することが本発明の目的である。

【0013】

さらに、該ペプチドが化学的合成、または、組換えDNA技術を用いて合成される上述のペプチドを提供することが、本発明の目的である。

【0014】

また、該ペプチドがジオチニル化されているか、または、システイン架橋を含む上述のペプチドを提供することが、本発明の目的である。

【0015】

さらに、上述のあらゆるペプチドの組合せ、そしてまた、上述の該ペプチドの組合せまたはペプチドを含む組成物を提供することが、本発明の目的である。

【0016】

加えて、HCV-関連ウイルスに対する曝露、または、感染を診断する方法であって、体液試料中に含まれる抗-HCV-関連ウイルス抗体を上述のペプチド、または、上述のペプチドの組合せと接触させること、体液試料中に含まれる抗-HCV-関連ウイルス抗体と上述のペプチド、若しくは、上述のペプチドの組合せとの結合を測定することを含む方法を提供することが、本発明の目的である。

【0017】

加えて、体液試料中の抗-HCV-関連ウイルス抗体の存在を検出するための分析用キットであって、固体担体、上述のペプチド若しくは上述のペプチドの組合せ、体液試料中の抗-HCV-関連ウイルス抗体と上述のペプチド若しくは上述のペプチドの組合せの間で形成される複合体の測定を可能にする適当なマーカーを含むキットを提供することが、本発明の目的である。

【0018】

加えて、本発明の目的は、ペプチドと抗-HCV-関連ウイルス抗体の相互作用を調節する化合物を同定するための生物学的検定法を提供することであり、該生物学的検定法は、抗-HCV-関連ウイルス抗体を上述のペプチド若しくは上述のペプチドの組合せと接触させ、抗-HCV-関連ウイルス抗体と上述のペプチド若しくは上述のペプチドの組合せの結合を測定し、モジュレーター（即ち、エンベロープタンパク質と抗-HCV-関連ウイルス抗体の相互作用を調節する化合物）若しくはモジュレーターの組合せを上述のペプチド若しくは上述のペプチドの組合せと接触させた抗-HCV-関連ウイルス抗体に添加し、抗-HCV-関連ウイルス抗体と上述のペプチド若しくは上述のペプチドの組合せとの結合の変化を測定することを含む。

【0019】

加えて、本発明の目的は、ペプチドと抗-HCV-関連ウイルス抗体の間の相互作用を調節する化合物を同定するための生物学的検定法を提供することであり、該生物学的検定法は、抗-HCV-関連ウイルス抗体と上述のペプチド若しくは上述のペプチドの組合せとの結合を測定し、上述のペプチド若しくは上述のペプチドの組合せとモジュレーターを接触させ、上述のペプチド若しくは上述のペプチドの組合せと接触させたモジュレーターに抗-HCV-関連ウイルス抗体を添加し、抗-HCV-関連ウイルス抗体と上述のペプチド若しくは上述のペプチドの組合せとの結合の変化を測定することを含む。

【0020】

さらに、上述の生物学的検定法によって製造される若しくは上述の生物学的検定法によって同定される、モジュレーター、モジュレーターを含む組成物、また

は、モジュレーターの組合せを提供することが、本発明の目的である。

【0021】

さらに、転写調節エレメントに作動可能に連結された、上述のペプチド、または上述のモジュレーターをコードする核酸配列を含むプラスミドベクターを含む組成物を提供することが、本発明の目的である。

【0022】

さらに、HCV-関連ウイルス若しくはそのあらゆる変異株による感染に対して、ヒトにワクチン注射をする、または、治療的処置をするのに用いるための、上述の組成物を提供することが、本発明の目的である。

【0023】

さらに、上述のHCV-関連ウイルスポリペプチドを特異的に認識する抗体、特に、モノクローナル抗体を提供することが、本発明の目的である。

【0024】

最後に、上述のペプチド若しくは上述のペプチドの組合せの使用を含む、HCV-関連ウイルスまたはそのあらゆる変異株による感染に対してヒトを免疫化する方法を提供することが、本発明の目的である。

【0025】

本発明の全ての目的は、以下に示される具体例により満たされ则认为られる。本発明のその他の有利な効果及び特色は、特許請求の範囲及び詳細な説明より明確になるであろう。

【0026】

表、及び、図面の簡単な説明

表1…表1は、本発明のペプチドが由来するエンベロープタンパク質及びHCV遺伝子型に関する情報を提供する。また、この表は、本発明のペプチドの名称、アミノ酸配列、エンベロープタンパク質中の位置、及び、配列番号(SEQ ID)も提供する。

表2…表2は、マルチマーペプチド及び組換えE2と60のHCV陽性試料及び4つのコントロール試料との反応性のELISAの結果(mODで)を示す。

表3…表3は、インターフェロン治療のレスポnderからの23の血清のE1抗

体についての分析を示す。

表4・・・表4は、インターフェロン治療のレスポnderからの²³の血清のE2抗体についての分析を示す。

表5・・・表5は、18人の患者におけるHCV E1及びE2領域に対する抗体を測定した、時間を追った病気の観測結果を示す。

表6・・・表6は、HGV(G型肝炎ウイルス)RNA陽性血清とHGV E1ペプチドV1V2との反応性を示す。

図1・・・図1は、HCVのE1エンベロープタンパク質の定常及び可変領域に関連する本発明のマルチマーペプチドの位置を明らかにする(HVR=超可変領域；V=可変領域；C=定常領域；HR=疎水性領域；SA=シグナルアンカードメイン；Y=グリコシル化；|=システイン)。

図2・・・図2は、HCVのE2エンベロープタンパク質の定常及び可変領域に関連する本発明のマルチマーペプチドの位置を明らかにする(HVR=超可変領域；V=可変領域；C=定常領域；SA=シグナルアンカードメイン；Y=グリコシル化；|=システイン)。

図3・・・図3は、20マー E2ペプチドの反応性を示す。慢性活性C型肝炎の患者からの血清試料のOD値を合計し、異なるペプチドに対して、プロットした。

図4・・・図4は、マルチマー E2ペプチドの反応性を示す。試料のOD値を合計し、異なるペプチドに対して、プロットした。試料は図3において用いたものと同じであろう。

【0027】

発明の詳細な説明

ここで説明される発明は、以前公開された研究及び出願中の特許出願を引用する。例として、このような研究は科学論文、特許または出願中の特許出願を含む。既に引用された、または、以下に引用されるこれらの全ての刊行物及び出願は、本明細書の一部を構成する。

【0028】

本発明は、例えばHCV及びHGV等の、HCV-関連ウイルスのエンベロープタンパク質由来の、一定の長さのマルチマーペプチドが、各々、例えば抗-H

C V抗体及び抗-H G V抗体等の抗-H C V-関連ウイルス抗体を認識し、該抗体に結合することを発見したことに基づく。従って、本発明は、抗-H C V-関連ウイルス抗体に結合し、該抗体を認識するH C V-関連ウイルスのエンベロープ領域由来の20を越える連続したアミノ酸からなるペプチドを提供する。

【0029】

H C V-関連ウイルスには、それらに限定されるわけではないが、H C V、G B V-Bウイルス、G B V-Aウイルス及びG B V-Cウイルス(H G VまたはG型肝炎ウイルス)が含まれる(Linnenら(1996年))。H C Vは、フラビウイルス科の一員であり、G型肝炎ウイルスと密接に関連している(アミノ酸レベルで26.8%)。H C V-関連ウイルスの「エンベロープ領域」という用語は、当業者には周知の領域であり(Wengler(1991年))、従来、非構造タンパク質1(N S 1)またはE 2/N S 1と呼ばれていたE 2タンパク質とE 1タンパク質を含む。

【0030】

さらに、体液試料中に存在する抗-H C V抗体または抗-H G V抗体に結合し、該抗体を認識する、配列番号1～38(表1参照)に示される配列からなる群、またはその機能的に均等なバリエーション若しくは断片から選択されるペプチドに、本発明は関連する。

【0031】

本発明はまた、該体液試料中に存在する抗-H C V抗体または抗-H G V抗体が、各々、抗-H C V-E 1若しくは抗-H C V-E 2抗体、または、抗-H G V-E 1若しくは抗-H G V-E 2抗体である、上述のペプチドに関連する。

【0032】

「ペプチド」という用語は、抗-H C V-関連ウイルス抗体に結合する、周知のH C V-関連ウイルスエンベロープタンパク質E 1及びE 2(Linnenら(1996年); Maertens及びStuyver(1997年))由来アミノ酸(アミノ酸)(即ち、より少ないアミノ酸を含む)のポリマーを意味する。「ペプチド」という用語は、特に、抗-H C V抗体に結合するH C Vエンベロープエンベロープタンパク質E 1及びE 2、または、抗-H G V抗体に結合するH G Vエンベロープタンパク質E 1及びE 2由来のアミノ酸のポリマーを意味する。

【0033】

「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、本明細書中で互換性を持って使われる。

【0034】

「抗-HCV-関連ウイルス抗体」という用語は、HCV-関連ウイルス粒子、若しくは、該ウイルス粒子由来のあらゆる分子に結合する、あらゆるポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を意味する。より詳しくは、「抗-HCV-関連ウイルス抗体」という用語は、HCVまたはHGVタンパク質由来の天然、組換え、若しくは、合成E1及び/またはE2タンパク質に結合する抗体を意味する（各々、抗-HCV-E1若しくは抗-HCV-E2抗体、または、抗-HGV-E1若しくは抗-HGV-E2抗体）。

【0035】

本明細書中で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、同質の抗体集団からなる抗体組成物を意味する。この用語は、抗体の種類または抗体源に関して制限を加えるものではなく、どのように製造されたかにより限定することを目的とするものでもない。

【0036】

さらに、「抗体」という用語は、免疫グロブリンのフレームワーク領域の一部がヒト免疫グロブリン由来であるヒト化抗体、米国特許第4,946,778号に記載される一本鎖抗体、並びに、Fab、F(ab')₂、Fv、及び、他の親抗体の抗原結合能及び特異性を保持する断片をも意味する。

【0037】

本明細書において使用される、「体液試料」という用語は、血清、血漿、唾液、胃分泌物、粘液、脊髄液等の、生物体から得られる液体を意味する。

【0038】

本明細書において使用される、「配列番号1～38に記載される配列からなる群」という用語は、本明細書の表1に記載の38個のペプチドを意味する。この表中には以下のことが示される：

(1)「タンパク質」と指定された欄には、ペプチドがどのHCVエンベロ

ータンパク質由来であるか記載し(但し、HGVのエンベロープタンパク質由来のものではE1(HGV)と記載)、

(2)「遺伝子型」と指定された欄には、エンベロープタンパク質が、従ってペプチドが由来するHCVの遺伝子型を記載し、HGVについては決定せず(ND)、

(3)「ペプチド」と指定された欄には、ペプチド領域の帰属を記載し、

(4)ペプチドのアミノ酸配列、及び

(5)「位置」と指定された欄には、周知(Maertens及びStuyver(1997年))

のペプチドのHCVエンベロープタンパク質内のアミノ酸位置を記載した(「ND」と示したものについては、E1エンベロープタンパク質の位置は決定しなかった点に留意せよ。)

【0039】

「その機能的に均等なバリエーションまたは断片」の中で使用される「機能的に均等」という用語は、抗-HCV-関連ウイルス抗体に結合する、配列番号1～38に示されるペプチドのバリエーション及び断片を意味する。「その機能的に均等なバリエーションまたは断片」の中で使用される「バリエーション及びフラグメント」という用語は、配列番号1～38に表されるペプチドのあらゆるバリエーション及び断片をも意味する。さらに、後の用語は、グリコシル化、アシル化、リン酸化、脂肪酸による修飾等の配列番号1～38で表されるペプチドの翻訳後修飾体のみを意味するわけでも、それらを除外するわけでもない。この定義には、例えば、アミノ酸の1またはそれ以上の類似体(アナログ)(人工アミノ酸を含む)を含むペプチド、置換された結合を有するペプチド、ペプチドの突然変異されたバージョン、または、その天然配列変異体(例えば、MaertensらのWO 94/12670号に記載の、HCV遺伝子型に相応)、システイン残基間にジスルフィド結合、その他のシステイン修飾を含むペプチド、ビオチニル化ペプチドと同様その他の公知の修飾が含まれる。治療または予防的な効力、安定性(例えば、エクス・ビボの貯蔵寿命及びイン・ビボにおけるタンパク質分解性消化に対する耐性)を増加させること、または、翻訳後修飾(例えば、タンパク質のリン酸化パターンを変える)こと等を目的として、ポリペプチド構造の修飾を行い得る。このような修飾されたペプチドは

、天然に存在する型のタンパク質の少なくとも1つの活性を保持するように設計されていれば、本明細書中においてより詳細に記載されているポリペプチドの機能的均等物とみなされる。このような修飾されたペプチドは、例えば、アミノ酸置換、欠失または付加により製造され得る。例えば、ロイシンのイソロイシンまたはバリンによる、アスパラギン酸のグルタミン酸による、スレオニンのセリンによる、または、アミノ酸の構造的に関連したアミノ酸による類似の置換(即ち、イソステリック及び/またはイソエレクトリック突然変異)は、その結果生じる分子の生物学的活性に重大な効果を示さないと推定することは妥当である。同型置換は、側鎖において同類のアミノ酸ファミリー内で起こるものである。遺伝的にコードされるアミノ酸は4つのファミリーに分類することができる：(1)酸性：アスパラギン酸、グルタミン酸；(2)塩基性：リジン、アルギニン、ヒスチジン；(3)非極性：アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；及び、(4)非荷電極性：グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。同様の方法により、アミノ酸レパートリーは次のように分類し得る、(1)酸性：アスパラギン酸、グルタミン酸；(2)塩基性：リジン、アルギニン、ヒスチジン；(3)脂肪族：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、場合によりセリンとスレオニンとは別に脂肪族-ヒドロキシルとしてグループ化し得る；(4)芳香族：フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン；(5)アミド型：アスパラギン、グルタミン；(6)含硫：システイン及びメチオニン(例えば「Biochemistry」第2版、L.Stryer編、WH Freeman and Co.(1981年)参照)。ペプチドのアミノ酸配列の変化の結果、機能的相同物(例えば、得られたポリペプチドが野生型の形態のものを模倣するという意味で機能的である)が得られるかは、例えばELISAで野生型タンパク質と似た様式の応答する、または、そのような応答を拮抗的に阻害するバリエーションペプチドの能力を評価することにより決定することができる。1以上の置換が導入されたポリペプチドについても、同様な手法により試験することができる。

【0040】

配列番号1～38に記載の抗体に結合するペプチド領域(いわゆるエピトープ)

は、必ずしも連続的アミノ酸配列である必要はないことは明らかである。

【0041】

これに関して、「断片」という用語は、これらの非連続的結合領域またはそれらの断片を含むあらゆる断片を含む。換言すれば、これらの結合領域を含む断片は、エピトープの機能部分でないリンカーにより分離され得る。このリンカーはアミノ酸配列である必要はなく、例えば、有機若しくは無機の、2若しくはそれ以上の断片からの所望のエピトープの形成を可能にする、いかなる分子でも有り得る。

【0042】

さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号1～5、7～9及び18のバリエーション及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸、33アミノ酸または34アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号6のバリエーション及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸または23アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号10のバリエーション及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸または28アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号11、15、21及び34のバリエーション及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸または33アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号12、24または32のバリエーション及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸、33アミノ酸、34アミノ酸または35アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書の配列番号13、22または34のバリエーション及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミ

ノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸または30アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号16のバリエント及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸、33アミノ酸、34アミノ酸、35アミノ酸、36アミノ酸、37アミノ酸、38アミノ酸、39アミノ酸または40アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号17のバリエント及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸または31アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号19のバリエント及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸、33アミノ酸、34アミノ酸、35アミノ酸、36アミノ酸または37アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号20及び30のバリエント及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号23のバリエント及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸、33アミノ酸、34アミノ酸、35アミノ酸、36アミノ酸、37アミノ酸、38アミノ酸、39アミノ酸、40アミノ酸、41アミノ酸、42アミノ酸または43アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号25または29のバリエント及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸または24アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号26のバリエント及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸または29ア

ミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号27のバリエーション及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸、33アミノ酸、34アミノ酸、35アミノ酸、36アミノ酸、37アミノ酸、38アミノ酸、39アミノ酸、40アミノ酸、41アミノ酸、42アミノ酸、43アミノ酸または44アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号28または31のバリエーション及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸または32アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号33のバリエーション及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸、33アミノ酸、34アミノ酸、35アミノ酸、36アミノ酸、37アミノ酸、38アミノ酸、39アミノ酸、40アミノ酸または41アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。さらに、本明細書中に記載されるように、配列番号14または37のバリエーション及び断片が、少なくとも21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸、33アミノ酸、34アミノ酸、35アミノ酸、36アミノ酸、37アミノ酸、38アミノ酸または39アミノ酸の長さのペプチドを含むことは明らかである。

【0043】

加えて、本明細書中において記載され、抗-HCV抗体に結合するペプチドのアミノ酸領域が実験により、より詳細に描写され得ることは当業者に受け入れられるであろう。

【0044】

加えて、配列番号1～38に記載のペプチドのバリエーション及び断片を、本明細書中において記載されるように、Houbenweyl(1974年)及びAtherton&Shepard(1989年)記載の古典的な化学合成、または、Maniatisら(1982年)若しくはSambrookら

(1989年)記載の組換えDNA技術等の当分野において公知のあらゆる方法により製造し得ることは明らかである。

【0045】

同様にまた、本発明の配列番号1～38に記載のペプチドが、当分野において公知のあらゆる方法、より特定していうと、Houbenweyl(1974年)及びAtherton&Shepard(1989年)記載の古典的な化学合成、または、Maniatisら(1982年)若しくはSambrookら(1989年)記載の組換えDNA技術によっても製造し得ることは明らかである。

【0046】

本発明はさらに、上記において定義した、ビオチニル化されるか、または、システイン架橋を含む配列番号1～38に記載のペプチド及びその機能的バリエーション若しくは断片に関連する。ビオチニル化されたペプチドは、例えばDeLeysのWO 93/18054号等に記載の、当分野において公知のあらゆる方法によって得ることができる。分子内及び/または分子間システイン架橋を含むペプチドを得る方法は、主にMaertens&StuyverのWO 96/13590号に記載されている。

【0047】

本発明はさらに、上述のように、配列番号1～38に記載のペプチド及びその機能的に均等なバリエーション、若しくは、断片のあらゆる組み合わせに関する。「あらゆる組合せ」という用語は、上述のペプチドのあらゆる可能な混合物、または、上述のペプチド間のあらゆる可能な結合(共有または他の)を意味する。後述のペプチドの組合せの例は、単純な混合物、ホモ-若しくはヘテロ-分枝状ペプチド、ストレプトアビジン、アビジン若しくはニュートラビジン上に提示されたビオチニル化ペプチドの組合せ、スペーサー付き若しくは無しの化学的に架橋されたペプチド、縮合されたペプチド及び組換え技術により製造されたペプチドである。

【0048】

本発明はまた、上述のようにHCV-関連ウイルスポリペプチドを特異的に認識することによって特徴付けられる抗体、特にモノクローナル抗体に関する。

【0049】

本発明はまた、H C V-関連ウイルスによる曝露または感染を診断する方法であって、体液試料中の抗-H C V-関連ウイルス抗体を上記のペプチドまたは上記のペプチドの組合せと接触させ、体液試料中の抗-H C V-関連ウイルス抗体と上記のペプチドまたは上記のペプチドの組合せとの結合を測定することを含む方法に関する。

【0050】

本明細書中において使用するように、「診断する方法」という用語は、ビオチン及びアビジン若しくはストレプトアビジンを含む分析、E L I S A、免疫沈降反応、並びに、凝集分析等を含む、当分野において公知のあらゆる免疫分析法を意味する。これらの分析法の詳細は、Maertens&StuyverのW O 96/13590号に記載されている。

【0051】

この点で、本発明はさらに、抗-H C V-関連ウイルス抗体の存在を検出するための分析用キットであり、固体担体、上記のペプチドまたはその機能的に均等なバリエーション若しくは断片、または上記のペプチドの組合せ、及び、体液試料中の抗-H C V-関連ウイルス抗体と上記のペプチドまたはその機能的に均等なバリエーション若しくは断片、または上記のペプチドに組合せとの間に形成された複合体の測定を可能にする適当なマーカーを含むキットに関する。

【0052】

「固体担体」という用語は、当分野において公知のあらゆる固体担体を意味する。

【0053】

同様に、「適当なマーカー」という用語は、当分野において公知のあらゆるマーカーを意味する。

【0054】

また、「診断する方法」という用語が、スクリーニング、検出、確認、モニター及び抗原型を決定する方法を包含することは明らかである。

【0055】

本発明はさらに、ペプチドと抗-H C V-関連ウイルス抗体との間の結合を調節

する化合物を同定する生物学的検定法であって、抗-HCV-関連ウイルス抗体を上述のペプチドまたは上述のペプチドの組合せと接触させ、抗-HCV-関連ウイルス抗体と上述のペプチドまたは上述のペプチドの組合せとの結合を測定し、上述のペプチドまたは上述のペプチドの組合せとの接触させた抗-HCV-関連ウイルス抗体にモジュレーターまたはモジュレーターの組合せを添加し、そして、最終的に抗-HCV-関連ウイルス抗体と上述のペプチドまたは上述のペプチドの組み合わせとの結合の変化を測定することを含む方法に関係する。

【0056】

別の態様において本発明は、ペプチドと抗-HCV-関連ウイルス抗体の間の結合を調節する化合物を同定する生物学的検定法であって、抗-HCV-関連ウイルス抗体と上述のペプチドまたは上述のペプチドの組合せとの結合を測定し、上述のペプチドまたは上述のペプチドの組合せとモジュレーターを接触させ、上述のペプチドまたは上述のペプチドの組合せと接触させたモジュレーターに抗-HCV-関連ウイルス抗体を添加し、抗-HCV-関連ウイルス抗体と上述のペプチドまたは上述のペプチドの組合せとの結合の変化を測定することを含む方法に関する。

【0057】

本明細書中において使用される、「化合物」という用語は、約25KDaより小さい、好ましくは10KDaより小さく、そして最も好ましくは5KDaより小さい分子量を有する組成物を意味する。化合物は、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド類似物、炭水化物、脂質、または他の有機若しくは無機の分子、または、宿主自体に対するワクチン注射により産生される抗体であり得る。

【0058】

本明細書中において使用される、「結合」という用語は、上述のペプチドが物理的に抗体に結合及び相互作用することを示唆する。ペプチドの抗体への結合は、結合-、ELISA及びRIA-型の分析若しくは競合分析等の、当分野において公知の方法若しくは分析(例えば、実施例部分及び免疫の最新のプロトコルを参照)によって明らかにすることができる。

【0059】

本明細書中において使用される、「変化(modulation)」または「調節する(modulate)」という用語は、ペプチドと抗-HCV抗体の間の結合を上向き調節(即ち、活性化または刺激(例えば、アゴニスト作用若しくは強化により))及びダウンレギュレーション(即ち、阻害または抑制(例えば、拮抗、減少させる若しくは阻害により))、させることの両方を意味する。

【0060】

「モジュレーター」という用語は、本明細書において使用されるように、上述のように調節する、上述のような化合物の能力を意味する。

【0061】

本明細書において使用される、「ペプチド類似物」という用語は、製造され得、抗体と上述のペプチドとの相互作用を調節するペプチドの残基を模倣する分子を意味する。例えば、ベンゾジアゼピン(例えば、Freidingerら、「Peptides:Chemistry and Biology」G.R.Marshall編、ESCOM Publisher、Leiden、Netherlands(1988年)参照)、アゼピン(例えば、Huffmanら、「Peptides:Chemistry and Biology」G.R.Marshall編、ESCOM Publisher、Leiden、Netherlands(1988年)参照)、PNA、置換 γ -ラクタム環(Garveyら、「Peptides:Chemistry and Biology」G.R.Marshall編、ESCOM Publisher、Leiden、Netherlands(1988年)参照)、ケトメチレン偽ペプチド(Ewensonら(1986年)、J.Med.Chem.、第29巻、第295頁；Ewensonら、「Peptides:Structure and Function」(Proceedings of the 9th American Peptide Symposium)Pierce Chemical Co.、Rockland、Ill.(1985年)参照)、 β -ターン ジペプチドコア(Nagaiら(1985年)、Tetrahedron Lett.、第26巻、第647頁；Satoら(1986年)、J.Chem.Soc.Perkin Trans.、第1巻、第1231頁)、及び、 β -アミノアルコール(Gordonら(1985年)、Biochem.Biophys.Res.Comm.、第126巻、第419頁；Dannら(1986年)、Biochem.Biophys.Res.Comm.、第134巻、第71頁)を用いてそのような残基の非-加水分解性ペプチドアナログを製造し得る。

【0062】

本発明は、上述の生物学的検定法によって製造されるモジュレーターに関する。

【0063】

本発明はまた、モジュレーターが上述の生物学的検定法によって製造される場合、ペプチドと抗-HCV-関連ウイルス抗体の間の相互作用のためのモジュレーターに関係する。

【0064】

本発明は、活性成分として上述のペプチドまたは上述のペプチドの組合せを含む組成物に関する。

【0065】

本発明はまた、活性成分として上述のモジュレーター、または、上述のモジュレーターの組合せを含む組成物に関する。

【0066】

別の態様において、本発明は、転写調節エレメントに作動可能に結合された、上述のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むプラスミドベクターを含む組成物に関連する。該プラスミドベクターをヒト細胞に導入することにより、イン・ビボでの該ヌクレオチド配列の発現、ひいてはコードされるタンパク質の産生が誘導される。該タンパク質が免疫応答を誘導する場合、それはDNAワクチンと呼ばれる。ヌクレオチド配列を変化させるヌクレオチド配列のバリエーション及び誘導体を作り得ることが、当業者には明らかである。変化させたポリヌクレオチドは、変化したヌクレオチド配列を持ち得るが、依然として、抗-HCV-関連ウイルス抗体と反応する上述のタンパク質をコードし、機能的な均等物とみなされる。

【0067】

好ましい態様において、本発明は、本明細書において記載されるように、HCV-関連ウイルスまたはそのあらゆる変異株による感染に対してヒトにワクチン注射する際に用いるための組成物に関する。

【0068】

別の好ましい態様において、本発明は、本明細書中において記載されるように、HCV-関連ウイルスまたはそのあらゆる変異株による感染に対してヒトを治療的に処置するのに用いるための組成物に関する。

【0069】

本発明の組成物は、適当な限り、ペプチド、その機能的に均等なバリエーション若しくは断片、ペプチドの組合せ、または、モジュレーター(例えば、本明細書中で生物学的検定により同定されたもの)を含む、本明細書中に記載されるあらゆる調製品であり得る。特に、「組成物」という用語は、特にHCV及び/またはHGVである、HCV-関連ウイルスの部分または全体のどちらに対しても、防護を誘導することができる免疫学的組成物に関する。

【0070】

「活性成分として」という用語は、特にHCV及び/またはHGVであるHCV-関連ウイルスに対する防護を誘導することができるワクチン組成物の構成成分に関する。活性成分(例えば、本発明のペプチドまたはモジュレーター)は、例えば、ビオチニル化形体(WO 93/18054号に説明される)及び/または製造者の使用説明書に従ってNeutralite Avidin(Molecular Probes Inc., Eugene, OR)に結合させて使用することができる。

【0071】

また、「組成物」には、活性成分に加えて、それ自体はその組成物を受ける個体において有害な抗体の産生を誘導せず、防護も誘導しない適当な賦形剤、希釈剤、キャリアー及び/またはアジュバントを含む。適当なキャリアーは、典型的には、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸共重合体、及び、不活性ウイルス粒子等の大きい、ゆっくりと代謝される高分子である。このようなキャリアーは、当業者には周知である。組成物の効果を増幅するのに好ましいアジュバンドには、これらに限定されるわけではないが、水酸化アルミニウム、WO 93/19780号に記載の3-O-デアシル化モノホスホリル脂質Aと一緒にされたアルミニウム、WO 93/24148号に記載のリン酸アルミニウム、米国特許第4,606,918号に記載のN-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミル-L-アラニン2(1', 2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホロキシ)エチルアミン、並びに、2%スクアレン/Tween 80エマルジョン中のモノホスホリル脂質A(緩和したエンドトキシン)、トレハロース-6,6-ジミコレート及び細胞壁骨

格(MPL+TDM+CWS)の1つまたは全てを含み得るRIBI (ImmunoChem Research Inc., Hamilton, MT)が含まれる。また、MPL、TDMまたはCWSをそれぞれ単独で、または、2つずつ組合せても用い得る。さらに、QS21及び3-デ-O-アシル化モノホスホリル脂質A(WO94/00153号)の間の組合せ、または、MF-59 (Chiron)、またはポリ[ジ(カルボキシアトフェノキシ)ホスファゼン]を基にしたアジュバント(Virus Research Institute)、またはOptiva x (Vaxel)若しくはGamma Inulin (Anutech)等のブロック共重合体を基にしたアジュバント、またはGerbu (Gerbu Biotechnik)と同様に、Stimulon (Cambridge Bioscience, Worcester, MA)、MF57 (Chiron)、または、SAF-1 (Syntex)等のアジュバントを用い得る。さらに、完全フロイントアジュバント及び不完全フロイントアジュバントを非ヒトに対して、及び、研究目的に用い得る。「組成物」はさらに、水、塩水、グリセロール、エタノール、保湿剤若しくは乳化剤、pH緩衝物質、保存剤等の本質的に非毒性及び非治療的の賦形剤及び希釈剤を含むだろう。典型的には、ワクチン用組成物は、注射可能な、液剤または懸濁液として調製される。注射用の固体形体、注射に適する溶液、懸濁液、注射前の液体ビヒクルとしても調製し得る。アジュバントの効果を上げるために、調製品を乳化またはリポソームカプセルに包むこともできる。ポリペプチドはまた、例えばQuil A (ISCOMS)であるサポニンと一緒に免疫刺激複合体中に混合することもできる。ワクチンとして使用し得る組成物は、免疫学的に有効な量の本発明のポリペプチド及び/またはモジュレーターを、上述のその他のあらゆる構成成分と同様に含む。「免疫学的に有効な量」は、該量の個人への投与が、単一用量または一連のものの1つとしてのどちらであれ、予防若しくは治療において有効であることを意味する。この量は、処置される個体の健康及び身体状態、処置される個体の分類されるグループ(例えば、非ヒト霊長類、霊長类等)、有効な免疫応答を引き出す個人の免疫系の能力、所望される防護の程度、ワクチンの製剤、処置を行う医者の評価、感染しているHCVの種類、並びに、他の関連する因子に依存して変化する。投与量が、ルーチンな試験によって決定され得る、比較的広範囲にわたることが期待される。一般に、投与量は0.01~1000 μ g/用量、より特定には0.1~100 μ g/用量の範囲である。ワクチンとして使用し得

る組成物は、非経口的に、典型的には注射により、例えば皮下若しくは筋肉内に、慣習的には投与される。

【0072】

DNAワクチンの場合、免疫応答を誘導するのに特に有用な方法には、所望のペプチドをコードするプラスミドベクターで金粒子をコートし、例えば遺伝子銃(例えば、Powderject Vaccines, Madison, WI, USAにより製造される)を手段として、それらを高圧下で表皮及び/または真皮に注射することが含まれる。

【0073】

別の投与方法に適した他の製剤には、経口製剤及び坐剤が含まれる。用量処置は、単一用量での計画、または複数用量での計画であり得る。ワクチンは他の免疫調節剤と一緒に投与し得る。ワクチンが個人の処置にも有用であることも留意されるべきで、その場合にワクチンは「ヒトの治療的処置」において用いられることとなる。

【0074】

本明細書中において使用される、「プラスミドベクター」は、それに結合された別の核酸を運搬することができる核酸分子を意味する。好ましいベクターは、自律複製及び/またはそれに結合された核酸を発現させることができるものである。一般的に、これらに限定されるわけではないが、プラスミドベクターは、ベクター形体では染色体に結合されていない環状二重結合DNAループである。発現目的の場合、プロモーターが必要とされる。DNAワクチンでは、ヒトサイトメガロウイルスのMajor Immediate Early(MIE)が非常に好ましいプロモーターである。

【0075】

本明細書中において使用される、「核酸配列」はデオキシリボヌクレオチド核酸(DNA)及び、それが適する場合、リボヌクレオチド核酸(RNA)等のポリヌクレオチドを意味する。この用語には、一本鎖(センス鎖若しくはアンチセンス鎖)及び二本鎖ポリヌクレオチドから作られるRNAまたはDNAの両方の類似物が均等物として含まれることが理解されるべきである。

【0076】

本明細書において使用される、「転写調節エレメント」という用語は、必須調節エレメント含むヌクレオチド配列、即ち、生きている脊椎細胞に導入すればそのポリヌクレオチドにコードされる翻訳産物を産生するよう細胞機構を導くことができるものを意味する。

【0077】

「作動可能に結合」という用語は、それらの通常の機能が示されるよう構成成分が形成された、並列状態(juxtaposition)を意味する。よって、核酸配列に作動可能に結合された転写調節エレメントは、該核酸配列の発現を行うことができる。様々な転写プロモーター、ターミネーター、キャリアーベクターまたは特異的遺伝子配列をうまく使用し得ることが、当業者には理解される。

【0078】

最後に、本発明は、HCV-関連ウイルス若しくはそのあらゆる変異株による感染に対してヒトを免疫化する方法であって、上述のペプチド、または、上述のペプチドの組合せの使用を含む方法を提供する。

【0079】

特定の有利な具体例を示す以下の実施例によって、本発明を説明する。しかしながら、これらの具体例は説明するためのものであり、本発明をいかなる意味でも限定するものと解釈すべきでない点に留意すべきである。

【0080】

実施例

実施例1. マルチマーE1及びE2ペプチドの合成

哺乳動物細胞において発現されるE1及びE2ペプチドに存在するものと類似した、エピトープを提示するペプチドを合成することを目指した。このようなエピトープは、大腸菌で発現されたE1及びE2タンパク質に存在していないようなので、そのようなペプチドを設計するのは容易ではなかった。まず最初に、異なるHCVの遺伝子型のE1及びE2一次アミノ酸配列を並べ、可変及び定常ドメインを明確にした。これらのドメイン、または、これらのドメインのうち2つまたはそれ以上の組合せが構造ドメイン、即ち、独立した構造ユニットを形成または構成すると推論した。3D構造として表示すると、これらの構造ドメインは

、また構造エピトープも含むかも知れない。後のドメインは、そのため、これらのエンベロープタンパク質が哺乳動物細胞において発現された場合にエンベロープタンパク質中に存在するのと同じような、天然様構造を採用している可能性がある。対照的に、このような構造は、エンベロープタンパク質が大腸菌等の原核細胞において発現された場合には存在しない。

【0081】

以下のドメインを、帰属させた：

V1、V2、V3、V4、V5、V6＝可変領域；C1、C2、C3、C4＝定常ドメイン；HR＝疎水性領域；SA＝シグナルアンカー配列；HVR I、HVR II＝E2の超可変領域。

| タンパク質領域 | アミノ酸位置 | タンパク質領域 | アミノ酸位置 |
|---------|---------|----------|---------|
| E1 V1 | 192-203 | E2 HVR I | 384-411 |
| C1 | 204-217 | C1 | 412-470 |
| V2 | 218-223 | HVR II | 471-482 |
| C2 | 224-229 | C2 | 483-521 |
| V3 | 230-242 | V3 | 522-548 |
| C3 | 243-247 | C3 | 549-569 |
| V4 | 248-257 | V4 | 570-580 |
| HR | 258-293 | C4 | 581-704 |
| V5 | 294-303 | SA | 705-746 |
| C4 | 304-329 | | |
| V6 | 330-342 | | |
| SA | 343-383 | | |

BE11サブタイプ1B分離株(PCR/E P 95/03031の配列番号50)のこれらのドメインに基づいて、24～25アミノ酸からなる長いペプチドを設計した。エンベロープタンパク質の長く伸びた幾つかのドメインについて、所望のドメインを包含するよう1以上のマルチマーペプチドを合成した。表1に、それぞれのアミノ酸位置と共にそのペプチドの概観を示した(番号付けは、HCVポリタンパク質の最初の開始コドンから始まる)。ペプチドは、WO 93/18054号に詳細に記載

されるようにt-Boc技術を用いて合成した。

【0082】

実施例2. マルチマーペプチドの患者血清中のE1及びE2抗体との反応性

慢性活性C型肝炎の患者からランダムに選択した60の試料のシリーズをマルチマーペプチドとの反応性について試験した。これらの試料は、HVR I由来の20マーペプチドの幾つかを除いて、20マーペプチドと顕著な反応性は示さなかった。比較のため、E2の親水性エクトドメイン、及び、組換えE2hタンパク質との反応性を分析した(E2hは、アミノ酸384-708に広がり、配列番号45からクローン化され、PCT/EP95/03031号に記載されるように発現し、精製した)。ペプチドをストレプトアビジンでコートしたプレートにコートし、血清試料中の抗体を載せ、INNOTEST HCV Ab IIIキット(Innogenetics, Gent, Belgium)の試薬及びその説明書に記載される手法を用いて反応、及び、検出するようにした。表2に、150mODのカットオフを用いた、ELISA試験の結果を示す。このシリーズでは、5つの血清がE2hタンパク質と反応性を示さず、このうち1つのみがHVR Iペプチドと反応した。60の血清のうち5つ(8%;例えば、試料17758)が、E2Hタンパク質のみと反応し、34(57%)がHVR Iを認識し、24(40%)がC1-aと、18(30%)がC1-bと、21(35%)がHVR IIと、17(28%)がC2-aと、22(37%)がC2-bと、18(30%)がC3と、18(30%)がC3'と、17(28%)がC3''と、18(30%)がV4と、22(37%)がC-4と、21(35%)がC4-aと、35(58%)がC4-bと、そして24(40%)がC4-cと反応した。この実験により驚くべきことに、HVR I由来のものを除いて、20マーペプチドの何れもが、どの試料によっても認識されなかったが、55個中50(91%)のE2h反応性血清が本発明のペプチドを用いて検出できた。

【0083】

インターフェロンα処置を長期にわたって受けていた慢性C型肝炎患者由来、及び、HCV感染された3匹のチンパンジー由来の、23の血清からなる第2のシリーズについてE1及びE2抗体を試験した。23試料中18(78%)が、PCT/EP95/03031号に記載されるように哺乳動物細胞中で発現され、精製された組換えE1sタンパク質と反応した。9つの試料(39%)がC4V6領域と、別の9つ(39%)

がV 1 V 2 領域と、3つがV 2 V 3 と反応した(表4)。比較のため、ペプチドV 5、即ち、S Q L F T I S P R R H E T V Q D も示す。

【0084】

第1の試料のシリーズと比べて、E 2 に対する異なる反応性が観察された(表4)。21の試料(91%)がE 2 h と反応し、13(57%)がH V R I 反応性で、9(39%)がC 1-a と、11(48%)がC 1-b と、1つがそれぞれH V R II、C 2-a、及び、C 2-b と、2つがC 3 と、3つがC 4-a と、4つ(17%)がC 4-b と、そして、4つ(17%)がC 4-c と反応した。このシリーズの病気の進行が良性の患者では、慢性活性肝炎患者由来の試料のシリーズと比べて、C 1 領域がより頻繁に認識され、C 4 に対する抗体はより少なくしか検出されなかった。これらの結果は、C 1、C 2 及びC 4 領域からのペプチドが、H C V-関連ウイルス病の進行をモニターするのに特に有用であることを示唆する。より特定すると、C 1 領域に対する抗体は、抗-C 4 抗体に比べてH C V をより良く中和し得る。従って、C 1 領域は、例えば、受容体結合活性を示すなど、機能的に重要かもしれない。従って、この領域の中和により、病気の活性がより抑えられ、快方に向かうかもしれない。従って、E 2-C 1 領域は特に治療的介入(therapeutic intervention)に特に有用かもしれない。一旦、或るドメインに対する反応性が確立されると、より小さなペプチドへとマッピングできる点に留意すべきである。例えば、C 2 に対する1つのチンパンジー血清の反応性を、より小さい25アミノ酸からなる領域(ペプチドC 3'')にマッピングすることができる。

【0085】

実施例3．インターフェロン α 治療を受けた患者におけるE 1 及びE 2 のモニタリング

インターフェロン治療を受けた患者由来の一連の試料についての、実施例2に記載されるE 2 抗体試験の結果が、表5に示される。長期にわたりインターフェロン治療を受けていた場合に、E 2 A b、及び、より大きい範囲でE 1 A b が減退することが、P C T/E P 95/03031号に記載された。本発明の幾つかのペプチドに対する反応性でも、同様の減退が見られる。患者2において例証されるように、時々、特有の反応性が観察される：再発したウイルスの発見に伴い、(E 1)

V4V5領域及び(E2)HVR II領域に反応する抗体が検出され、これらはウイルスの除去と同時に迅速に消えた。従って、(E1)V4V5及び(E2)HVR IIは、特に病気の治療において、病気をモニターするのに特に有用であり得る。他の(E2)C1(実施例2)、及び表5において太字で示されるペプチド等のペプチドもまた、モニタリング等において有用なようである。表2は、さらに患者2における、HVR IまたはC1ペプチドに対する検出可能な反応性がない状態での、HVR IとC1の間の連結に当る新規ペプチドHVR I-C1に対する反応性の存在を示す。同様に、C4-bとC4-cの間の領域を含むペプチドC4-bcが、このシリーズにおいて試験され、ペプチドC4-bと比べてほぼ同等の反応性を示した。従って、C4-bエピトープはアミノ酸658及び673の間に有り得るが、驚くべきことにPCT/EP 95/03031号の配列番号92のペプチド(アミノ酸655-674)には存在しないようである。C4-cエピトープは、C4-bcには存在しないので、アミノ酸683と706の間に位置され得る。

【0086】

実施例4. 他のフラビウイルスへの適用

本発明の、他のHCV-関連ウイルスのエンベロープタンパク質に対する応用範囲を調べるため、G型肝炎ウイルス(GBV-C; Linnenら(1996年); Simonsら(1996年))のE1領域のV1V2領域に相当するペプチドを合成した(配列番号38(表1)参照):

NH²-THACRANGQYFLTNCAPEDI GFCL EGGCLVALGGK-ビオチン。

これまでのところ、完全HGV E2タンパク質に対する反応性のみがHGVの診断において有用なようであった。GBVエンベロープタンパク質E1またはE2のペプチドエピトープについては記述されたことがない。16のHGV RNA陽性血清が試験され、これらのうちの1つが、表6に示されるようにE1ペプチドと反応性であった。組換えHGV E2タンパク質(HGV E2ペプチドではない)に対する抗体の反応性が、ヨーロッパの人種の最大15%で見つかったが、HGV RNA及びE2Abの両方が見つかる場合は、たぶんそのような場合というのは、血清変換及びウイルス排除の進行を表すので、まれであった。HGV

E1タンパク質に対する抗体反応は今のところ報告されていない。従って、HGV E1ペプチドV1V2は新規であり、そしてこれは、HGV抗-E2反応性血清ではより高い反応性を示すかもしれない。本発明に記載されるものと類似の手法により、HGV E2ペプチドもまた合成され得る。GBV-AまたはGBV-Bからのマルチマーペプチドが、HCV及びHGVについて記載されたものと同様の手法により合成され得る。

【0087】

実施例5. 20-マーE2ペプチドの反応性のマルチマーE2ペプチドとの比較

表1に記載のE2ペプチドの、慢性活性C型肝炎患者からの32の血清試料との反応性について分析した。さらに、より長いペプチドで用いた、表1に記載されるものと全く同じHCVサブタイプ1b配列の、重なり合う20-マーペプチドのシリーズを合成した。用いたELISA試験は、実施例2に記載されたものと同じものであった。図3及び4には、それぞれ、20-マー及びより長いペプチドシリーズの反応性を示す。合計>5のペプチド(HVRI、HVRI/C1、C1a、C1b、C4a、C4b、C4c、C4b-c)が、E2に対する抗体の検出に非常に有用であると考えられた。これらのペプチドのうち総計6つ(ペプチドC4b-cとC1aは、これらのペプチドが完全に他のペプチドに含まれているので含まなかった)を、場合により患者の血清の一部と反応した20-マーペプチド1350(表1)と組合せた。これらのペプチドの組合せは、慢性活性HCVキャリアー由来の128の血清を用いたパネル調査により試験した。これらの試験された血清のうち126が組換えE2sタンパク質について陽性であった。これら126の血清のうち33の血清が、組換えE2タンパク質に比べて少なくとも2倍高いOD値をペプチド混合物に対して示し、64が似たような反応性を示し、16の血清が、ペプチド混合物と比べて2~4倍高い反応性を組換えタンパク質に対して示し、13の血清は組換えタンパク質のみと反応した。

【0088】

要約すると、組換えE2タンパク質に対する抗体を含む血清のほぼ90%を、上述のペプチド混合物を用いて検出することができた。血清の26%については、組換えE2タンパク質を用いるよりも、本発明のペプチドを用いた検出の方がよか

った。OD値の合計が5を越えるもの(即ち、ペプチドHVR I、HVR I/C 1、C 1 a、C 1 b、C 4 a、C 4 b、C 4 c、及び、C 4 b-c(図4)により示される)は、HCVのE 2タンパク質に対する抗体の血清診断において驚くほど高い値であると考えられる。上述の実験より、組換えE 2と本発明のペプチドの組合せが、特に組成物として有用であることが明らかである。異なるHCV遺伝子型のE 2タンパク質の変異性を考慮すると、組換えE 2タンパク質に遺伝子型特異的ペプチドを加えることは、E 2抗体分析における感度を向上させるための望ましい方法かもしれない。例えば、報告されているHCV 2 a型の配列HC-J 6に基づくペプチドC 1 aのバリエーションは、L I N T N G S W H I N R T A L N C N D S L H T G F L A S L F Y T H S Fであり得、そして、例えば遺伝子型3 a配列に基づく類似の有用なバリエーションが合成及び反応性について試験され得る。HCV E 2タンパク質が、どの所定のHCV遺伝子型においても挿入または欠失を含み得る点に注意すべきである。例えば、サブタイプ1 a及び1 b型配列は、ギャップを挿入する必要なしに並べることができる連続した配列を示すが、HCV 2 a型分離体は、1型の配列と比べて4アミノ酸長いE 2タンパク質をコードする。例えば、HCV 2 a及び2 b型配列の超可変領域II(HVR II)付近に2個のアミノ酸が挿入されている。従って、HC-J 6原型2 a配列に基づく、ペプチドHVR IIの潜在的に有用なバリエーションは、30-マーペプチドのR S I E A F R V G W G A L Q Y E D N V T N P E D M R P Y C Wであり、それに対し、表1に記載のサブタイプ1 b配列に基づくペプチド(配列番号20)は、28アミノ酸の長さしかない。サブタイプ2 a配列に挿入された2つのグルタミン酸(記号E)には下線を引いて示している。同様のペプチドを以前に報告された配列及び整列に基づいて簡単に構築することができる(例えば、Maertens及びStuyver(1997年))。

【0089】

Atherton, Shepard(1989)Solid phase peptide synthesis.IRL Press, Oxford.

Chien D, Choo Q-L, Ralston R, Spaete R, Tong M, Houghton M, Kuo G.

Persistence of HCV despite antibodies to both putative envelope proteins.The Lancet 1993;342:933.

- Current protocols in immunology. Coligan J., Kruisbeek A., Margulis D., Shevach E., 及び Strober W. 編, .Wiley Interscience, 1992.
- Houbenweyl (1974) Methode der organischen Chemie, vol.15, I&II (Wunch 編). Thieme, Stuttgart.
- Hsu H, Donets M, Greenberg H 等. Characterization of hepatitis C virus structural proteins with a recombinant baculovirus expression system. Hepatology 1993;17:763-71.
- Inoue Y, Suzuki R, Matsuura Y 等. Expression of the amino-terminal half of the NS1 region of the hepatitis C virus genome and detection of an antibody to the expressed protein in patients with liver disease. J. Gen. Virol. 1992;73:2151-4.
- Kohara M, Tsukiyama-Kohara K, Maki N. 等. Expression and characterization of glycoprotein gp35 of hepatitis C virus using recombinant vaccinia virus. J. Gen. Virol. 1992;73:2313-8.
- Ling PD, Warren MK, Vogen SN. 等. J. Immunol. 1985;135:1857-63.
- Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck Z, Fry K, Krawczynski K, Alter H, Koonin E 等. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. Science 1996;271:505-8.
- Maertens G. 及び Stuyver L. (1997) Genotypes and Genetic variation of hepatitis C virus. "Molecular Medicine of Hepatitis" 中. (Zuckerman A. 及び Harrison T. 編), Molecular Medical Science Series (James K. 及び Morris A. 編) John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England, 第13章, 第183-233頁.
- Major M.E. 及び Feinstone S.M. The molecular virology of hepatitis C. Hepatology 1997;25:1527-1538.
- Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Mita E, Hayashi N, Ueda K. Expression of MBP-HCV NS1/E2 fusion protein in E.coli and detection of anti-NS1/E2 antibody in type C chronic liver disease. Biochem.Biophys.Res.Comm. 1992;183:925-30.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, Muerhoff AS. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1996;92:3401-5.
- Wengler G. (1991) Family Flaviviridae. "Classification and Nomenclature of viruses, fifth report of the international committee on Taxonomy and nomenclature of viruses (Francki R., Fauquet C, Knudson D., 及び Brown F. 編)" Archives of Virology, Supplementum 2, 第223-233頁, Springer-Verlag, Wien, New York.
- Yokosuka O, Ito Y, Imazeki F, Ohto M, Omata M. Detection of antibody to hepatitis C E2/NS1 protein in patients with type C hepatitis. Bioch Biophys Res Commun 1992;189:565-71.

【0090】

【表1-1】

【表1-2】

| タンパク質 | 遺伝子型 | ペプチド | アミノ酸配列 | 位置 | 配列番号 |
|-------|-------|---------|-------------------------------------------|---------|-----------|
| E1 | 1a | V1V2T1a | YQVRNSTGLYHVTNDCPNSSIVYEADAILHTPGC | 192-226 | Seq ID 1 |
| | 1b | V1V2T1b | YEVRNVSGIYHVTNDCSNSSIVYEADMIMHTPGC | 192-226 | Seq ID 2 |
| | 2c | V1V2T2c | VEVKNNNSYMATNDCSNSSIIWQLEGAVLHTPGC | 192-226 | Seq ID 3 |
| | 2c | V1V2T2c | VEVKNTSTSYMVTNDCSNSSIWQLEGAVLHTPGC | 192-226 | Seq ID 4 |
| | 3a | V1V2T3a | LEWRNTSGLYVLTNDCSNSSIVYEADVILHTPGC | 192-226 | Seq ID 5 |
| | 3a | V2T3a | LTNDCSNSSIVYEADVILHTPGC | 203-226 | Seq ID 6 |
| | 4c/4k | V1V2T4a | INYNVSGIYHVTNDCPNSSIVYEADHHILHLP GC | 192-226 | Seq ID 7 |
| | 5a | V1V2T5a | VPYRNASGIYHITNDCPNSSIVYEADNLILHAPGC | 192-226 | Seq ID 8 |
| | 6a | V1V2T6a | LYGNSSGLYHLTNDCSNSSIVLEADAMILHLPGC | 192-226 | Seq ID 9 |
| | 1b | V2V3 | IYEEAADMIMHTPGCVPCVRENNSSRCWV | 212-240 | Seq ID 10 |
| | 1b | V3V4 | VRENNSSRCWVALTPTLAARNASVPTTTIRRHVD | 230-263 | Seq ID 11 |
| | 1b | PC-V3V4 | PCVRENNSSRCWVALTPTLAARNASVPTTTIRRHVD | 228-263 | Seq ID 12 |
| | 1b | HR | HVDLLVGAAAFCSAMYVGDLCGSVFLVSQL | 260-290 | Seq ID 13 |
| | 1b | V5C4 | SQLFTISPRRHETVQDCNCSIYPGHITGHRMAWDMMNWWS | 288-327 | Seq ID 14 |
| | 1b | C4V6 | SIYPGHITGHRMAWDMMNWSPPTTALVVSQLLRI | 307-340 | Seq ID 15 |
| | 1b | SA | PQAVWDMVAGAHWGVLAGLAYYSMVGNWAKVLVWMLLFAGV | 341-381 | Seq ID 16 |
| | 1b | V4V5 | VALTPTLAARNASVPTTTIRRHVDSQLFTISPRRHETVQD | 240-303 | Seq ID 37 |

【表 1 - 3】

| タンパク質 | 遺伝子型 | ペプチド | アミノ酸配列 | 位置 | 配列番号 |
|---------|------|--------|-----------------------------------------------|---------|-----------|
| E1(HGV) | ND | V1V2 | THACRANGQYFLTNCCAPEDIGFCLEGGCLVALGGK | ND | Seq ID 38 |
| E2 | 1b | HVR I | HTRVSGGAASNTRGLVSLFSPGSAQKIQLVN | 384-415 | Seq ID 17 |
| | 1b | C1a | LVNTNGSWHINRTALNCNDSLQGTGFFAALFYKHKF | 413-447 | Seq ID 18 |
| | 1b | C1b | NDSLQGTGFFAALFYKHKFNSGGERLASCERSIDKFAQ | 430-467 | Seq ID 19 |
| | 1b | HVR II | RSIDKFAQGWGPLYTEPNSSDQRPYCW | 460-487 | Seq ID 20 |
| | 1b | C2a | SDQRPYCWHYAPRPCGIVPASQVCGPVYCFTPSP | 480-513 | Seq ID 21 |
| | 1b | C2b | SQVCGPVYCFTPSPVVGTTDRFGVPTYNWG | 500-530 | Seq ID 22 |
| | 1b | V3C3 | GVPTYNWGANDSDVLILNTRPPRGNWFGCTWMNGTGFTKTCGG | 523-566 | Seq ID 23 |
| | 1b | V3C3' | ANDSDVLILNTRPPRGNWFGCTWMNGTGFTKTCGG | 531-566 | Seq ID 24 |
| | 1b | C3'' | TRPPRGNWFGCTWMNGTGFTKTCGG | 542-566 | Seq ID 25 |
| | 1b | V4 | TKTCGGPPCNIGGAGNNTLCPTDCFRKHP | 561-590 | Seq ID 26 |
| | 1b | C4 | TDCFRKHFEATYARCGSGPWLTPRCMVHYPYRLWHYPCTVNFITF | 583-627 | Seq ID 27 |
| | 1b | C4' | ARCGSGPWLTPRCMVHYPYRLWHYPCTVNFITF | 595-627 | Seq ID 28 |
| | 1b | C4'' | LTPRCMVHYPYRLWHYPCTVNFITF | 603-627 | Seq ID 29 |
| | 1b | C4a | TVNFTIFKVRMYVGGVEHRFEACNWTR | 621-648 | Seq ID 30 |
| | 1b | C4b | EAACNWTRGERCDLEDNRSELSPLLLSTTEWQ | 641-673 | Seq ID 31 |
| | 1b | C4c | QWQILPCSFTTLPALSTGLIHLHQNIVDVQYLYGVG | 671-706 | Seq ID 32 |

【表 2 - 1】

| タンパク質 | 遺伝子型 | ペプチド | アミノ酸配列 | 位置 | 配列番号 |
|-------|------|----------|--------------------------------------------|---------|-----------|
| E2 | 1b | SA | GVGSVVSVSLVIKWEYVLLFLLLADARICACLWMMLLIAQAE | 704-745 | Seq ID 33 |
| | 1b | HVR I/C1 | NTRGLVSLFSPGSAQKIQLVNTNGSWHINRTALN | 395-428 | Seq ID 34 |
| | 1b | C4b-c | DRSELSPLLSTTEWQILPCSFITLTPALSTG | 658-688 | Seq ID 35 |
| | 1b | 1350 | VGTTDRFGVPTYNWWGANDSD | 516-535 | Seq ID 36 |

| 試料 # | HVR I | C1-a | C1-b | HVR II | C2-a | C2-b | E2-13 B | C3 | C3' | C3" | V4 | C4 | C4-a | C4-b | C4-c | SA | 組換え E2 |
|---------|-------|------|------|--------|------|------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-----|-----------|
| 17758 | 69 | 48 | 47 | 52 | 49 | 48 | 47 | 49 | 38 | 44 | 43 | 52 | 44 | 55 | 48 | 46 | 1355 |
| 17763 | 88 | 54 | 44 | 49 | 52 | 48 | 51 | 51 | 46 | 45 | 48 | 49 | 45 | 133 | 104 | 50 | 361 |
| 17764 | 100 | 148 | 138 | 134 | 128 | 136 | 141 | 136 | 136 | 65 | 130 | 145 | 144 | 242 | 128 | 127 | 371 |
| 17766 | 91 | 97 | 145 | 96 | 80 | 87 | 90 | 90 | 95 | 47 | 75 | 89 | 163 | 139 | 99 | 86 | 173 |
| 17771 | 307 | 79 | 54 | 65 | 51 | 50 | 65 | 68 | 50 | 45 | 60 | 65 | 59 | 96 | 132 | 58 | 393 |
| 17775 | 49 | 50 | 46 | 39 | 50 | 271 | 43 | 51 | 48 | 45 | 50 | 55 | 52 | 54 | 47 | 50 | 228 |
| 17777 | 60 | 133 | 105 | 130 | 129 | 123 | 118 | 118 | 130 | 95 | 119 | 133 | 129 | 357 | 177 | 113 | 850 |
| 17779 | 373 | 328 | 285 | 330 | 284 | 343 | 281 | 323 | 316 | 283 | 297 | 318 | 343 | 341 | 309 | 282 | 720 |
| 17785 | 81 | 80 | 73 | 71 | 76 | 66 | 81 | 70 | 74 | 70 | 69 | 79 | 79 | 87 | 119 | 73 | 146 |
| 17786 | 341 | 863 | 693 | 152 | 164 | 179 | 148 | 139 | 146 | 136 | 137 | 158 | 160 | 163 | 148 | 157 | 720 |
| 17788 | 111 | 553 | 120 | 137 | 69 | 121 | 121 | 119 | 111 | 110 | 103 | 140 | 132 | 131 | 48 | 47 | 934 |
| 17789 | 1316 | 49 | 47 | 46 | 49 | 45 | 53 | 51 | 48 | 43 | 42 | 50 | 49 | 52 | 48 | 48 | 1178 |
| 17790 | 234 | 233 | 182 | 223 | 130 | 224 | 185 | 185 | 186 | 184 | 179 | 216 | 218 | 1347 | 853 | 207 | 1534 |
| 17791 | 269 | 194 | 177 | 192 | 123 | 203 | 172 | 192 | 157 | 184 | 184 | 200 | 195 | 211 | 187 | 190 | 287 |
| 17797 | 260 | 264 | 248 | 257 | 240 | 281 | 249 | 237 | 246 | 221 | 223 | 283 | 261 | 272 | 231 | 243 | 1357 |
| 17798 | 52 | 53 | 50 | 47 | 52 | 54 | 50 | 53 | 49 | 51 | 50 | 51 | 50 | 1036 | 51 | 51 | 1161 |
| 17799 | 225 | 89 | 81 | 86 | 85 | 100 | 76 | 85 | 87 | 82 | 84 | 86 | 92 | 115 | 86 | 76 | 362 |
| 17802 | 42 | 51 | 44 | 47 | 50 | 133 | 48 | 52 | 51 | 48 | 51 | 56 | 76 | 773 | 157 | 56 | 882 |
| 17807 | 49 | 133 | 60 | 59 | 66 | 62 | 62 | 59 | 57 | 56 | 57 | 63 | 65 | 62 | 57 | 52 | 605 |
| 17808 | 89 | 121 | 117 | 109 | 106 | 1051 | 118 | 875 | 133 | 116 | 123 | 126 | 393 | 228 | 109 | 126 | 1354 |

【表2-2】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|
| 17810 | 327 | 220 | 199 | 222 | 195 | 200 | 221 | 182 | 197 | 182 | 196 | 209 | 266 | 222 | 195 | 199 | 422 |
| 17818 | 224 | 134 | 115 | 126 | 118 | 115 | 128 | 108 | 109 | 98 | 111 | 113 | 112 | 117 | 109 | 108 | 230 |
| 17821 | 671 | 243 | 214 | 282 | 238 | 232 | 228 | 217 | 234 | 197 | 216 | 222 | 218 | 557 | 810 | 205 | 1046 |
| 17825 | 397 | 320 | 264 | 284 | 282 | 286 | 289 | 277 | 276 | 274 | 276 | 306 | 273 | 391 | 399 | 277 | 514 |
| 17826 | 92 | 109 | 111 | 99 | 114 | 126 | 113 | 98 | 104 | 84 | 105 | 121 | 122 | 126 | 145 | 113 | 695 |
| 17827 | 45 | 47 | 46 | 47 | 48 | 49 | 48 | 49 | 49 | 47 | 49 | 50 | 50 | 261 | 113 | 47 | 320 |
| 17832 | 151 | 65 | 55 | 70 | 78 | 63 | 77 | 72 | 68 | 59 | 64 | 70 | 62 | 54 | 57 | 49 | 288 |
| 17838 | 212 | 167 | 166 | 164 | 156 | 165 | 164 | 146 | 160 | 154 | 150 | 165 | 165 | 161 | 272 | 157 | 305 |
| 17839 | 48 | 94 | 117 | 61 | 61 | 51 | 58 | 51 | 46 | 52 | 58 | 55 | 87 | 60 | 95 | 66 | 182 |
| 17840 | 318 | 323 | 347 | 317 | 329 | 338 | 320 | 305 | 326 | 302 | 312 | 343 | 355 | 322 | 318 | 337 | 417 |
| 17842 | 161 | 174 | 185 | 176 | 168 | 163 | 159 | 157 | 163 | 156 | 150 | 168 | 151 | 154 | 138 | 153 | 195 |
| 17844 | 122 | 94 | 90 | 88 | 98 | 78 | 92 | 88 | 84 | 77 | 85 | 94 | 61 | 214 | 51 | 73 | 166 |
| 17849 | 1469 | 68 | 75 | 49 | 54 | 629 | 52 | 53 | 46 | 46 | 51 | 54 | 119 | 1102 | 55 | 47 | 1393 |
| 17870 | 125 | 236 | 148 | 114 | 128 | 133 | 135 | 116 | 132 | 109 | 135 | 151 | 118 | 293 | 120 | 45 | 197 |
| 17879 | 209 | 195 | 201 | 222 | 195 | 215 | 225 | 191 | 194 | 181 | 218 | 209 | 209 | 255 | 253 | 199 | 325 |
| 17983 | 438 | 54 | 50 | 48 | 52 | 46 | 50 | 54 | 46 | 46 | 51 | 52 | 46 | 55 | 53 | 48 | 216 |
| 17999 | 276 | 201 | 200 | 202 | 190 | 187 | 191 | 169 | 176 | 150 | 190 | 205 | 186 | 321 | 535 | 198 | 697 |
| 8242 | 162 | 114 | 114 | 127 | 140 | 114 | 120 | 117 | 103 | 120 | 117 | 107 | 112 | 161 | 152 | 128 | 340 |
| 8243 | 188 | 191 | 171 | 175 | 204 | 172 | 189 | 174 | 186 | 174 | 176 | 205 | 200 | 206 | 177 | 178 | 225 |
| 8247 | 248 | 169 | 137 | 127 | 120 | 110 | 122 | 96 | 111 | 104 | 114 | 128 | 104 | 130 | 150 | 118 | 215 |
| 8250 | 129 | 161 | 127 | 150 | 164 | 144 | 154 | 125 | 134 | 122 | 142 | 151 | 125 | 146 | 137 | 140 | 165 |
| 8317 | 112 | 131 | 115 | 123 | 113 | 111 | 144 | 95 | 103 | 95 | 108 | 118 | 108 | 158 | 126 | 111 | 198 |
| 8320 | 463 | 433 | 337 | 473 | 435 | 445 | 363 | 345 | 503 | 384 | 362 | 369 | 405 | 446 | 432 | 378 | 474 |
| 8329 | 119 | 126 | 123 | 160 | 143 | 145 | 142 | 117 | 135 | 121 | 122 | 126 | 131 | 152 | 148 | 132 | 163 |
| 8330 | 198 | 271 | 210 | 210 | 207 | 196 | 216 | 178 | 194 | 206 | 209 | 215 | 186 | 356 | 45 | 51 | 536 |

【表2-3】

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 8332 | 154 | 141 | 128 | 141 | 132 | 116 | 129 | 110 | 123 | 112 | 135 | 140 | 123 | 147 | 312 | 144 | 290 |
| 8333 | 57 | 67 | 50 | 51 | 52 | 52 | 50 | 54 | 50 | 50 | 50 | 56 | 48 | 480 | 65 | 52 | 1108 |
| 8334 | 283 | 66 | 64 | 80 | 68 | 69 | 84 | 79 | 65 | 52 | 67 | 74 | 72 | 180 | 191 | 90 | 348 |
| 8337 | 162 | 105 | 99 | 108 | 103 | 92 | 104 | 86 | 93 | 80 | 101 | 107 | 108 | 124 | 118 | 110 | 142 |
| 8339 | 50 | 49 | 52 | 62 | 54 | 46 | 54 | 51 | 47 | 41 | 51 | 55 | 53 | 413 | 49 | 50 | 247 |
| 8344 | 59 | 52 | 50 | 51 | 58 | 48 | 54 | 52 | 47 | 48 | 55 | 53 | 58 | 63 | 63 | 60 | 59 |
| 8351 | 163 | 114 | 105 | 111 | 101 | 91 | 98 | 97 | 92 | 78 | 110 | 111 | 115 | 141 | 179 | 112 | 154 |
| 8362 | 211 | 54 | 50 | 47 | 55 | 119 | 53 | 53 | 44 | 45 | 51 | 54 | 59 | 60 | 58 | 55 | 165 |
| 8364 | 110 | 308 | 106 | 112 | 112 | 107 | 98 | 102 | 108 | 92 | 116 | 152 | 133 | 208 | 169 | 132 | 671 |
| 8365 | 69 | 84 | 94 | 67 | 77 | 74 | 55 | 73 | 70 | 69 | 70 | 79 | 73 | 69 | 88 | 66 | 86 |
| 8367 | 218 | 189 | 171 | 201 | 204 | 174 | 191 | 156 | 158 | 140 | 183 | 186 | 294 | 197 | 186 | 171 | 303 |
| 8374 | 575 | 113 | 95 | 114 | 110 | 93 | 100 | 92 | 106 | 88 | 103 | 125 | 118 | 112 | 111 | 106 | 143 |
| 8377 | 364 | 232 | 229 | 225 | 211 | 202 | 233 | 189 | 207 | 170 | 209 | 205 | 230 | 234 | 218 | 221 | 293 |
| 8382 | 314 | 211 | 187 | 196 | 207 | 173 | 208 | 181 | 158 | 150 | 181 | 187 | 201 | 223 | 189 | 211 | 265 |
| 8383 | 51 | 100 | 102 | 55 | 58 | 48 | 57 | 53 | 53 | 50 | 52 | 57 | 66 | 94 | 63 | 56 | 285 |
| V1200 | 52 | 55 | 52 | 56 | 55 | 53 | 50 | 54 | 50 | 52 | 51 | 50 | 50 | 52 | 53 | 54 | 50 |
| V1201 | 118 | 147 | 138 | 136 | 224 | 144 | 123 | 137 | 140 | 111 | 135 | 154 | 166 | 171 | 137 | 155 | 162 |
| V1202 | 274 | 308 | 284 | 170 | 290 | 286 | 282 | 248 | 277 | 229 | 271 | 306 | 287 | 330 | 268 | 295 | 329 |
| V1204 | 130 | 134 | 135 | 127 | 141 | 128 | 79 | 113 | 119 | 106 | 131 | 144 | 145 | 144 | 130 | 144 | 159 |

【表3】

| 試料 # | E1 抗原 | | V3V4 | HR/SA | V5 | C4V6 | rec E1s |
|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| | ペプチドなし | V1V2 | | | | | |
| 試料なし | 0.011 | 0.007 | 0.011 | 0.014 | 0.009 | 0.007 | 0.009 |
| 30108 | 0.03 | 0.035 | 0.04 | 0.034 | 0.032 | 0.03 | 0.234 |
| 30109 | 0.032 | 0.033 | 0.035 | 0.028 | 0.024 | 0.026 | 0.227 |
| 30110 | 0.021 | 0.545 | 0.02 | 0.019 | 0.016 | 0.017 | 0.047 |
| 30111 | 0.017 | 0.614 | 0.019 | 0.018 | 0.017 | 0.015 | 0.064 |
| 30112 | 0.037 | 0.069 | 0.035 | 0.034 | 0.031 | 0.031 | 0.048 |
| 30113 | 0.042 | 0.083 | 0.136 | 0.039 | 0.034 | 0.035 | 0.063 |
| 30114 | 0.042 | 0.099 | 0.036 | 0.035 | 0.035 | 0.037 | 0.058 |
| 30115 | 0.021 | 0.114 | 0.023 | 0.021 | 0.02 | 0.02 | 0.189 |
| 30116 | 0.019 | 0.442 | 0.025 | 0.022 | 0.022 | 0.018 | 0.056 |
| 30117 | 0.027 | 0.062 | 0.047 | 0.043 | 0.041 | 0.038 | 0.066 |
| 30118 | 0.122 | 0.216 | 0.126 | 0.12 | 0.11 | 0.125 | 0.696 |
| 30119 | 0.023 | 0.028 | 0.031 | 0.028 | 0.023 | 0.024 | 0.23 |
| 30120 | 0.025 | 0.024 | 0.027 | 0.025 | 0.039 | 0.027 | 0.03 |
| 30121 | 0.03 | 0.033 | 0.033 | 0.029 | 0.052 | 0.034 | 0.037 |
| 30122 | 0.029 | 0.031 | 0.056 | 0.03 | 0.052 | 0.033 | 0.035 |
| 30123 | 0.085 | 0.081 | 0.076 | 0.075 | 0.087 | 0.071 | 0.094 |
| 30124 | 0.022 | 0.084 | 0.022 | 0.022 | 0.023 | 0.022 | 0.193 |
| 30125 | 0.095 | 0.128 | 0.091 | 0.089 | 0.172 | 0.159 | 0.47 |
| 17805 | 0.038 | 0.051 | 0.039 | 0.033 | 0.09 | 0.154 | 0.738 |
| 13059 | 0.011 | 0.011 | 0.012 | 0.012 | 0.014 | 0.012 | 0.229 |
| Chimp1 | 0.095 | 0.38 | 0.276 | 0.126 | 0.098 | 0.095 | 0.099 |
| Chimp2 | 0.026 | 0.234 | 0.143 | 0.035 | 0.036 | 0.038 | 0.354 |
| Chimp3 | 0.018 | 0.017 | 0.02 | 0.022 | 0.023 | 0.019 | 0.141 |

【表 4】

【表5-1】

| 試料 | E2 抗原 | | | | | | | | | | | | | | 組換え E2h | |
|----------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|------------|-------|
| | ペプチド | HVR I | C1-a | C1-b | HVR II | C2-a | C2-b | C3 | C3' | C3" | V4 | C4 | C4-a | C4-b | | C4-c |
| 試料なし | 0.006 | 0.009 | 0.011 | 0.015 | 0.007 | 0.006 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.007 | 0.007 | 0.009 | 0.032 |
| 30108 | 0.036 | 0.747 | 0.848 | 0.969 | 0.032 | 0.033 | 0.03 | 0.04 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.041 | 0.026 | 0.031 | 0.988 |
| 30109 | 0.027 | 0.849 | 0.93 | 1.053 | 0.027 | 0.032 | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.038 | 0.023 | 0.026 | 1.079 |
| 30110 | 0.018 | 0.026 | 0.021 | 0.044 | 0.019 | 0.024 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.023 | 0.026 | 0.056 | 0.11 |
| 30111 | 0.017 | 0.02 | 0.021 | 0.088 | 0.018 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.022 | 0.028 | 0.07 | 0.137 |
| 30112 | 0.037 | 0.092 | 0.052 | 0.177 | 0.044 | 0.048 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.043 | 0.562 | 0.053 | 0.947 |
| 30113 | 0.045 | 0.104 | 0.054 | 0.276 | 0.051 | 0.047 | 0.05 | 0.03 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.054 | 0.633 | 0.07 | 1.003 |
| 30114 | 0.045 | 0.112 | 0.075 | 0.726 | 0.046 | 0.041 | 0.05 | 0.05 | 0.03 | 0.04 | 0.04 | 0.06 | 0.054 | 0.646 | 0.067 | 1.065 |
| 30115 | 0.022 | 0.982 | 0.034 | 0.064 | 0.025 | 0.025 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.097 | 0.031 | 0.413 |
| 30116 | 0.015 | 0.023 | 0.02 | 0.04 | 0.017 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.023 | 0.022 | 0.046 | 0.084 |
| 30117 | 0.04 | 0.087 | 0.048 | 0.119 | 0.037 | 0.044 | 0.05 | 0.05 | 0.03 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.041 | 0.547 | 0.049 | 0.935 |
| 30118 | 0.112 | 0.213 | 0.122 | 0.119 | 0.119 | 0.121 | 0.12 | 0.12 | 0.11 | 0.05 | 0.11 | 0.1 | 0.117 | 0.105 | 0.2 | 0.289 |
| 30119 | 0.03 | 0.954 | 1.012 | 1.128 | 0.026 | 0.029 | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.035 | 0.026 | 0.03 | 1.123 |
| 30120 | 0.031 | 0.427 | 0.208 | 0.208 | 0.03 | 0.033 | 0.03 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.033 | 0.032 | 0.032 | 0.577 |
| 30121 | 0.033 | 0.734 | 0.463 | 0.398 | 0.037 | 0.042 | 0.04 | 0.05 | 0.04 | 0.03 | 0.04 | 0.03 | 0.04 | 0.034 | 0.037 | 0.963 |
| 30122 | 0.03 | 0.661 | 0.413 | 0.365 | 0.043 | 0.034 | 0.03 | 0.04 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.038 | 0.03 | 0.034 | 0.907 |
| 30123 | 0.079 | 0.11 | 0.576 | 0.789 | 0.09 | 0.108 | 0.09 | 0.08 | 0.08 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.091 | 0.078 | 0.077 | 0.916 |
| 30124 | 0.02 | 0.939 | 0.041 | 0.065 | 0.028 | 0.237 | 0.04 | 0.04 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.02 | 0.038 | 0.108 | 0.049 | 0.4 |
| 30125 | 0.096 | 0.133 | 0.103 | 0.096 | 0.097 | 0.115 | 0.15 | 0.14 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.1 | 0.1 | 0.092 | 0.183 | 0.227 |
| 17805 | 0.042 | 0.255 | 0.074 | 0.078 | 0.071 | 0.045 | 0.06 | 0.06 | 0.05 | 0.04 | 0.06 | 0.04 | 0.163 | 0.043 | 0.831 | 0.881 |
| 13059 | 0.013 | 0.47 | 0.02 | 0.019 | 0.018 | 0.022 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.36 | 0.052 | 0.904 | 0.944 |
| チンパンジー-1 | 0.102 | 0.103 | 0.116 | 0.118 | 0.23 | 0.109 | 0.12 | 0.19 | 0.17 | 0.19 | 0.1 | 0.1 | 0.087 | 0.098 | 0.095 | 0.581 |
| チンパンジー-2 | 0.028 | 0.181 | 0.267 | 0.261 | 0.056 | 0.032 | 0.03 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.188 | 0.035 | 0.033 | 1.008 |
| チンパンジー-3 | 0.058 | 0.035 | 0.162 | 0.086 | 0.026 | 0.062 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.023 | 0.02 | 0.026 | 1.327 |

【表5-2】

| 試料 HCV 患者 1 | E1 ペプチド | | | | | | | | | |
|----------------|---------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | PCR | V1V2 遺伝子型 | V1V2 | V2V3 | V3V4 | V4V5 | HR/SA | V5C4 | C4V6 | E1s |
| 14/8/90 | pos | 3a | 0.014 | 0.03 | 0.06 | 0.034 | 0.037 | 0.048 | 0.045 | 0.051 |
| 01/06/91 | | | 0.03 | 0.032 | 0.064 | 0.041 | 0.041 | 0.051 | 0.048 | 0.045 |
| 20/9/91 | neg | | 0.06 | 0.064 | 0.064 | 0.037 | 0.039 | 0.05 | 0.398 | 0.045 |
| 13/3/92 | | | 0.034 | 0.041 | 0.037 | 0.034 | 0.037 | 0.046 | 0.044 | 0.04 |
| 04/09/92 | neg | | 0.037 | 0.041 | 0.039 | 0.037 | 0.037 | 0.052 | 0.048 | 0.043 |
| 24/9/93 | | | 0.048 | 0.051 | 0.05 | 0.046 | 0.052 | 0.048 | 0.047 | 0.042 |
| 20/10/94 | neg | | 0.045 | 0.048 | 0.398 | 0.044 | 0.048 | 0.047 | 0.045 | 0.041 |
| 23/10/95 | | | 0.051 | 0.045 | 0.045 | 0.04 | 0.043 | 0.042 | 0.041 | 0.051 |
| 10/12/96 | pos? | | 0.037 | 0.041 | 0.033 | 0.034 | 0.035 | 0.039 | 0.038 | 0.045 |
| 患者 2 | | | | | | | | | | |
| 15/2/90 | | | 0.106 | 0.103 | 0.104 | 0.108 | 0.104 | 0.949 | 0.872 | 1.03 |
| 03/05/90 | pos | 1a | 0.103 | 0.109 | 0.106 | 0.104 | 0.108 | 0.828 | 0.859 | 1.04 |
| 04/12/90 | | | 0.096 | 0.103 | 0.105 | 0.103 | 0.095 | 0.737 | 0.848 | 1.218 |
| 23/9/91 | | | 0.063 | 0.078 | 0.078 | 0.067 | 0.072 | 0.318 | 0.354 | 0.66 |
| 14/4/92 | | | 0.099 | 0.106 | 0.099 | 0.1 | 0.096 | 0.219 | 0.255 | 0.491 |
| 18/12/92 | | | 0.104 | 0.106 | 0.102 | 0.105 | 0.101 | 0.222 | 0.249 | 0.448 |
| 26/3/93 | | | 0.089 | 0.095 | 0.09 | 0.085 | 0.082 | 0.168 | 0.194 | 0.357 |
| 30/9/93 | neg | | 0.092 | 0.081 | 0.089 | 0.09 | 0.088 | 0.17 | 0.18 | 0.35 |
| 17/6/94 | pos | 1a | 0.084 | 0.09 | 0.096 | 0.599 | 0.095 | 0.154 | 0.166 | 0.32 |
| 18/12/95 | | | 0.072 | 0.077 | 0.077 | 0.077 | 0.081 | 0.111 | 0.121 | 0.206 |
| 23/12/96 | neg | | 0.065 | 0.078 | 0.074 | 0.073 | 0.078 | 0.106 | 0.108 | 0.199 |
| 患者 3 | | | | | | | | | | |
| 15/04/93 | | | 0.005 | 0.006 | 0.005 | 0.004 | 0.006 | 0.005 | 0.006 | 0.007 |
| 06/09/94 | pos | 3a | 0.007 | 0.008 | 0.007 | 0.008 | 0.007 | 0.006 | 0.006 | 0.009 |

【表5-3】

| | | | | | | | | | |
|----------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 30/10/95 | neg | 0.007 | 0.01 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.008 | 0.007 | 0.011 |
| 18/11/96 | pos? | 0.012 | 0.012 | 0.011 | 0.01 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.012 |
| 患者 4 | | | | | | | | | |
| 12/04/91 | pos | 0.006 | 0.007 | 0.006 | 0.006 | 0.007 | 0.006 | 0.006 | 0.01 |
| 23/09/91 | neg | 0.01 | 0.01 | 0.008 | 0.009 | 0.009 | 0.006 | 0.008 | 0.013 |
| 27/07/92 | neg | 0.007 | 0.009 | 0.007 | 0.008 | 0.007 | 0.006 | 0.007 | 0.01 |
| 11/06/93 | neg | 0.009 | 0.011 | 0.009 | 0.01 | 0.009 | 0.007 | 0.006 | 0.011 |
| 29/11/96 | pos | 0.007 | 0.01 | 0.008 | 0.007 | 0.007 | 0.005 | 0.006 | 0.008 |
| 患者 5 | | | | | | | | | |
| 18/09/92 | pos | 0.017 | 0.01 | 0.008 | 0.007 | 0.008 | 0.178 | 0.196 | 0.537 |
| 17/12/93 | neg | 0.012 | 0.014 | 0.011 | 0.01 | 0.011 | 0.039 | 0.04 | 0.231 |
| 15/11/96 | neg | 0.012 | 0.014 | 0.012 | 0.01 | 0.01 | 0.026 | 0.017 | 0.116 |
| 患者 6 | | | | | | | | | |
| 10/05/90 | pos | 0.311 | 0.006 | 0.007 | 0.005 | 0.006 | 0.004 | 0.01 | 0.544 |
| 11/10/91 | neg | 0.284 | 0.007 | 0.007 | 0.006 | 0.007 | 0.006 | 0.013 | 0.605 |
| 患者 7 | | | | | | | | | |
| 10/10/91 | pos | 0.009 | 0.01 | 0.009 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.01 | 0.043 |
| 18/12/92 | neg | 0.01 | 0.011 | 0.011 | 0.009 | 0.009 | 0.008 | 0.011 | 0.043 |
| 28/06/93 | neg | 0.006 | 0.006 | 0.007 | 0.006 | 0.007 | 0.005 | 0.008 | 0.021 |
| 10/03/97 | pos | 0.008 | 0.008 | 0.007 | 0.008 | 0.007 | 0.006 | 0.008 | 0.012 |
| 患者 8 | | | | | | | | | |
| 19/08/91 | neg | 0.008 | 0.009 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.006 | 0.008 | 0.009 |
| 17/07/95 | pos | 0.01 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.006 | 0.007 | 0.007 | 0.018 |
| 09/10/95 | pos | 0.007 | 0.007 | 0.008 | 0.005 | 0.006 | 0.007 | 0.007 | 0.009 |
| 15/12/95 | neg | 0.008 | 0.009 | 0.008 | 0.009 | 0.008 | 0.007 | 0.007 | 0.011 |
| 04/03/96 | neg | 0.009 | 0.011 | 0.01 | 0.011 | 0.009 | 0.008 | 0.007 | 0.01 |

【表 5 - 4】

| | | | | | | | | | | |
|----------|-----|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 02/09/96 | neg | | 0.01 | 0.011 | 0.011 | 0.01 | 0.01 | 0.008 | 0.008 | 0.013 |
| 患者 9 | | | | | | | | | | |
| 26/03/91 | pos | 1b/2ac | 0.044 | 0.015 | 0.022 | 0.023 | 0.028 | 0.031 | 0.034 | 0.115 |
| 21/12/93 | neg | | 0.033 | 0.017 | 0.021 | 0.027 | 0.022 | 0.025 | 0.023 | 0.048 |
| 20/12/94 | pos | 1b | 0.023 | 0.016 | 0.015 | 0.028 | 0.019 | 0.028 | 0.034 | 0.077 |
| 21/12/95 | pos | 1b | 0.019 | 0.029 | 0.024 | 0.027 | 0.027 | 0.031 | 0.034 | 0.048 |
| 患者 10 | | | | | | | | | | |
| 27/04/92 | pos | 1b | 0.128 | 0.024 | 0.02 | 0.023 | 0.026 | 0.118 | 0.449 | 0.68 |
| 01/06/93 | neg | | 0.107 | 0.03 | 0.029 | 0.027 | 0.026 | 0.098 | 0.385 | 0.667 |
| 患者 11 | | | | | | | | | | |
| 09/11/90 | neg | | 0.018 | 0.019 | 0.012 | 0.013 | 0.015 | 0.087 | 0.141 | 0.591 |
| 12/07/91 | pos | 1b | 0.023 | 0.023 | 0.016 | 0.02 | 0.018 | 0.073 | 0.1 | 0.466 |
| 28/05/93 | pos | | 0.008 | 0.009 | 0.009 | 0.005 | 0.008 | 0.123 | 0.173 | 0.495 |
| 20/01/95 | neg | | 0.011 | 0.009 | 0.008 | 0.007 | 0.007 | 0.026 | 0.047 | 0.187 |
| 08/01/96 | neg | | 0.012 | 0.013 | 0.01 | 0.009 | 0.009 | 0.025 | 0.031 | 0.21 |
| 07/02/97 | neg | | 0.019 | 0.019 | 0.014 | 0.014 | 0.013 | 0.027 | 0.051 | 0.203 |
| 患者 12 | | | | | | | | | | |
| 11/05/92 | pos | 1b | 0.017 | 0.013 | 0.011 | 0.014 | 0.015 | 0.227 | 0.173 | 0.425 |
| 26/02/93 | neg | | 0.022 | 0.014 | 0.013 | 0.013 | 0.014 | 0.178 | 0.264 | 0.417 |
| 12/08/93 | pos | 1b | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.014 | 0.015 | 0.29 | 0.387 | 0.63 |
| 患者 13 | | | | | | | | | | |
| 07/01/91 | pos | 1b | 0.027 | 0.017 | 0.021 | 0.026 | 0.026 | 0.04 | 0.074 | 0.062 |
| 19/08/91 | neg | | 0.018 | 0.018 | 0.015 | 0.013 | 0.012 | 0.021 | 0.009 | 0.043 |
| 21/08/92 | pos | | 0.015 | 0.012 | 0.015 | 0.014 | 0.017 | 0.015 | 0.021 | 0.023 |
| 06/08/93 | neg | | 0.019 | 0.018 | 0.016 | 0.021 | 0.016 | 0.01 | 0.011 | 0.02 |
| 06/03/95 | pos | 1b | 0.027 | 0.026 | 0.018 | 0.015 | 0.018 | 0.02 | 0.023 | 0.028 |

| | | | | | | | | | |
|----------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 12/04/96 | neg | 0.03 | 0.017 | 0.018 | 0.036 | 0.021 | 0.027 | 0.027 | 0.022 |
| 患者 14 | | | | | | | | | |
| 22/11/94 | pos | 0.016 | 0.011 | 0.013 | 0.013 | 0.026 | 0.318 | 0.437 | 0.461 |
| 11/10/95 | pos | 0.024 | 0.014 | 0.014 | 0.018 | 0.019 | 0.039 | 0.061 | 0.059 |
| 15/02/96 | neg | 0.032 | 0.022 | 0.021 | 0.023 | 0.016 | 0.031 | 0.041 | 0.102 |
| 患者 15 | | | | | | | | | |
| 04/12/90 | pos | 0.003 | 0.005 | 0.005 | 0.004 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.019 |
| 29/11/90 | neg | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.006 | 0.005 | 0.008 | 0.006 | 0.011 |
| 09/10/92 | pos | 0.006 | 0.008 | 0.007 | 0.007 | 0.007 | 0.006 | 0.005 | 0.012 |
| 25/03/96 | neg | 0.006 | 0.008 | 0.007 | 0.006 | 0.006 | 0.004 | 0.007 | 0.012 |
| 患者 16 | | | | | | | | | |
| 16/12/91 | pos | 0.003 | 0.004 | 0.006 | 0.004 | 0.004 | 0.08 | 0.102 | 0.435 |
| 04/10/93 | neg | 0.006 | 0.007 | 0.007 | 0.006 | 0.008 | 0.028 | 0.033 | 0.253 |
| 12/09/94 | neg | 0.004 | 0.008 | 0.006 | 0.005 | 0.005 | 0.034 | 0.038 | 0.197 |
| 09/09/96 | neg | 0.004 | 0.008 | 0.007 | 0.006 | 0.005 | 0.008 | 0.013 | 0.08 |
| 患者 17 | | | | | | | | | |
| 24/04/97 | pos | 0.076 | 0.006 | 0.008 | 0.004 | 0.009 | 0.203 | 0.327 | 1.196 |
| 患者 18 | | | | | | | | | |
| 08/01/97 | neg | 0.006 | 0.007 | 0.007 | 0.007 | 0.006 | 0.006 | 0.008 | 0.009 |
| ブランク | | 0.006 | 0.009 | 0.009 | 0.006 | 0.006 | 0.007 | 0.006 | 0.009 |

【表 6】

| 試料# | ブランク | E1 | V1 | V2 |
|-------|------|----|------|-----|
| 20188 | 68 | | | 74 |
| 20189 | 77 | | | 73 |
| 20251 | 170 | | | 150 |
| 20252 | 490 | | 1319 | |
| 20253 | 92 | | | 70 |
| 20254 | 50 | | | 55 |
| 20255 | 81 | | | 88 |
| 20256 | 56 | | | 62 |
| 20266 | 119 | | | 134 |
| 20271 | 77 | | | 78 |
| 20272 | 61 | | | 69 |
| 21010 | 129 | | | 135 |
| 21011 | 159 | | | 161 |
| 21012 | 120 | | | 93 |
| 21286 | 108 | | | 105 |

【図面の簡単な説明】

【図1】HCVのE1エンベロープタンパク質の定常及び可変領域に関連する本発明のマルチマーペプチドの位置を明らかにする(HVR=超可変領域；V=可変領域；C=定常領域；HR=疎水性領域；SA=シグナルアンカードメイン；Y=グリコシル化；I=システイン)。

【図2】HCVのE2エンベロープタンパク質の定常及び可変領域に関連する本発明のマルチマーペプチドの位置を明らかにする(HVR=超可変領域；V=可変領域；C=定常領域；SA=シグナルアンカードメイン；Y=グリコシル化；I=システイン)。

【図3】20マー E2ペプチドの反応性を示す。慢性活性C型肝炎の患者からの血清試料のOD値を合計し、異なるペプチドに対して、プロットした。

【図4】マルチマー E2ペプチドの反応性を示す。試料のOD値を合計し、異なるペプチドに対して、プロットした。

【図 1】

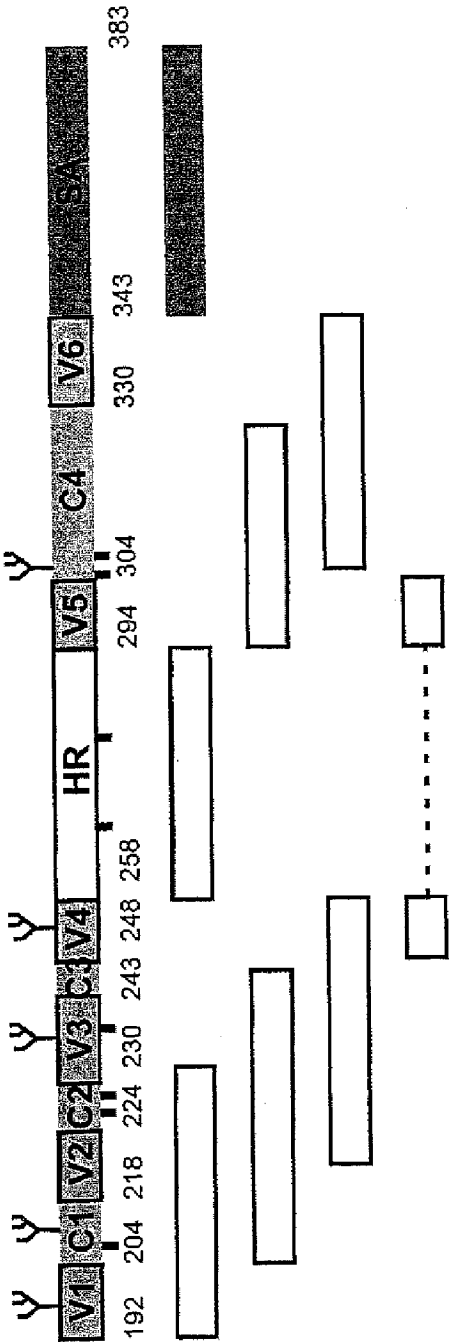


Figure 1

【図2】

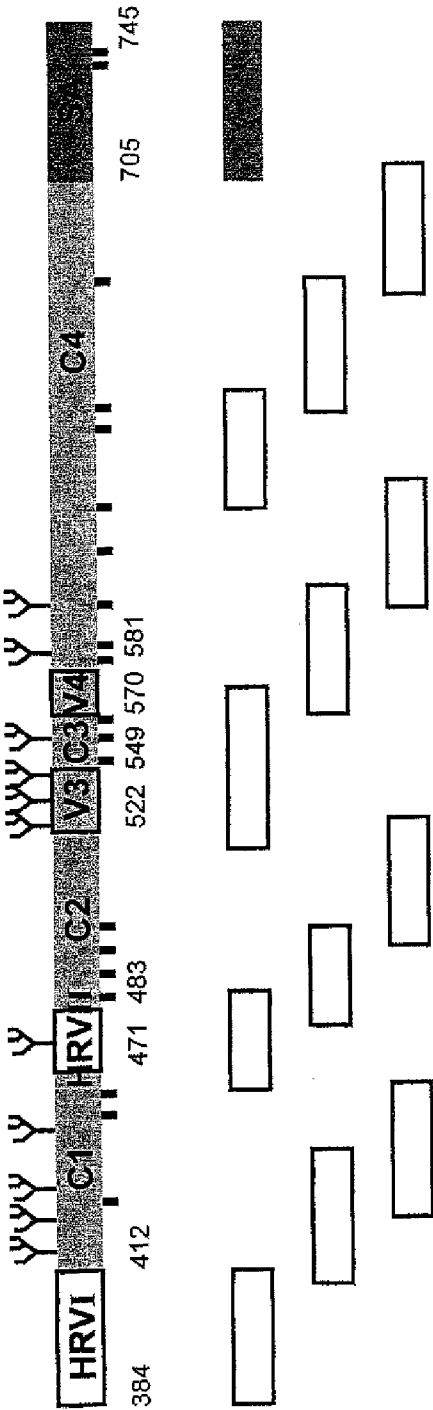
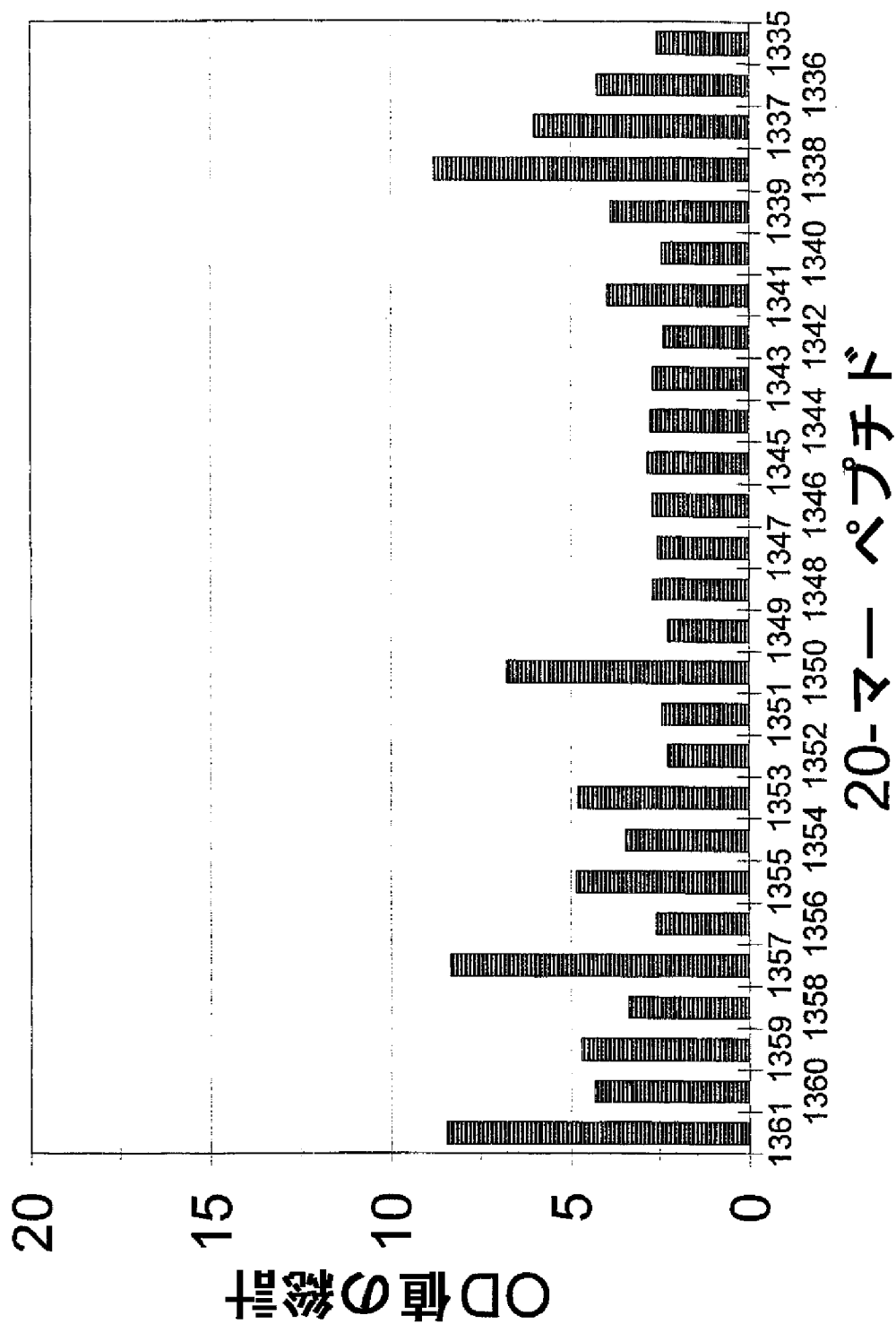
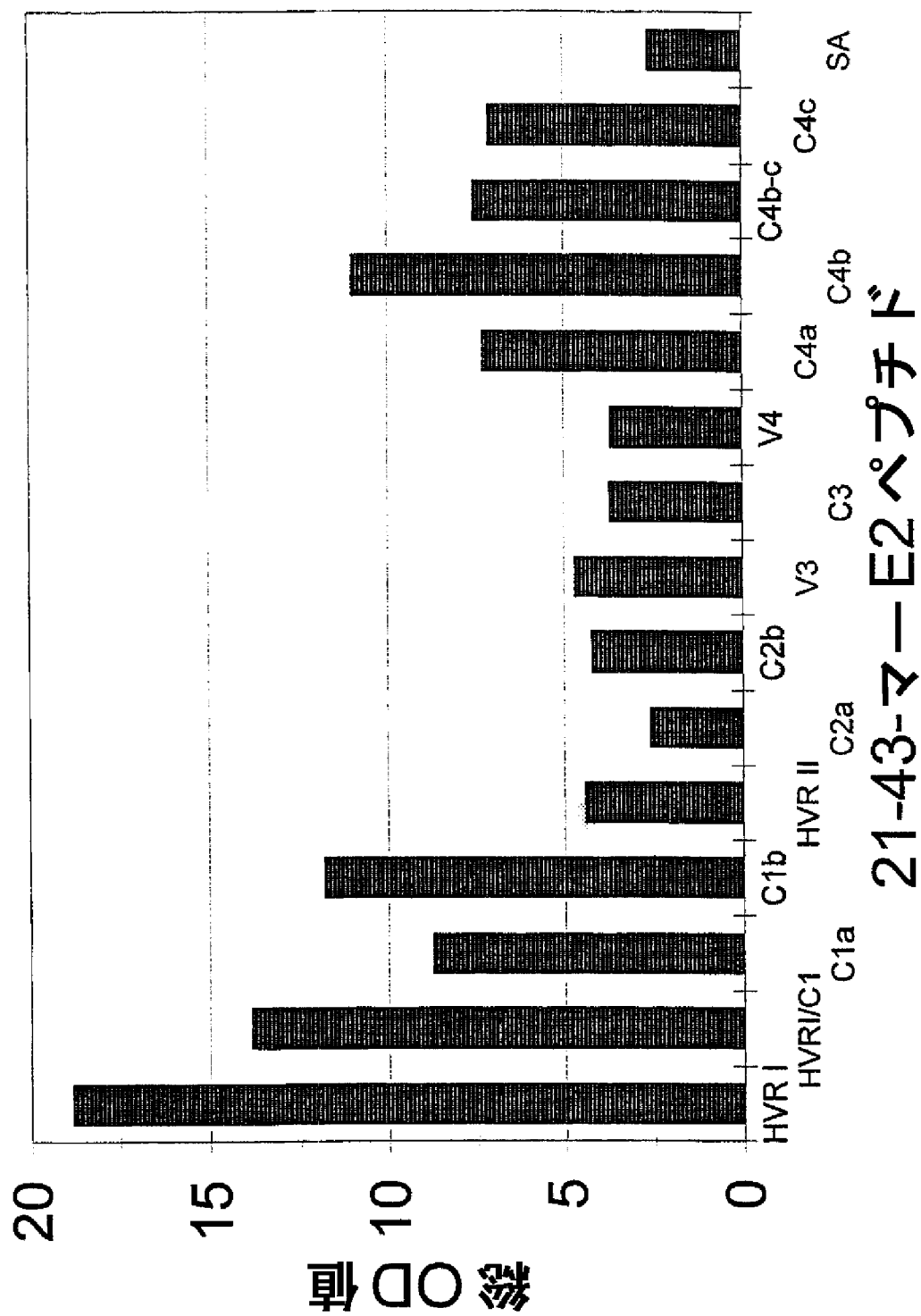


Figure 2

【図3】



【図4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| | | national Application No. PCT/EP 98/07105 |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07K14/18 G01N33/68 A61K39/29 C12N15/51 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K G01N A61K C12N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | EP 0 445 423 A (ABBOTT LAB) 11 September 1991 see claims; examples; table 11 | 1-5,8 |
| X | WO 93 06247 A (ABBOTT LAB) 1 April 1993 see claims; examples; table 8 | 1-5,8 |
| X | WO 93 06488 A (GENELABS TECH INC) 1 April 1993 see page 52, line 22 - page 60, line 10; claims; examples; table 3 | 1-11 |
| X | WO 95 12677 A (INNOGENETICS NV ; LEROUX ROELS GEERT (BE); DELEYS ROBERT (BE); MAER) 11 May 1995 * SeqId's 20, 22, 29, 41-44, 105-107, 165 * see claims; examples | 1-11 |
| -/- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p> | | |
| Date of the actual completion of the international search 29 April 1999 | | Date of mailing of the international search report 07/05/1999 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5010 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Fuhr, C |

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/EP 98/07105

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | EP 0 468 527 A (UNITED BIOMEDICAL INC) 29 January 1992 see claims; examples; table 8A | 1-11 |
| X | WO 96 04385 A (INNOGENETICS NV ;MAERTENS GEERT (BE); BOSMAN FONS (BE); MARTYNOFF) 15 February 1996 * Seq ID's 57, 58, 67, 82, 83, 86, 87, 88 * see claims; examples | 1-3,5, 8-11 |
| X | WO 93 02103 A (SORIN BIOMEDICA SPA) 4 February 1993 see page 7, line 1 - line 9 see page 13 - page 15; claims 4,7,10 | 1-5,8 |
| X | WO 94 25874 A (LUCKY LTD ;CHO JOONG MYUNG (KR); CHOI DEOG YOUNG (KR); CHOI DONG S) 10 November 1994 see claim 2; example 6 | 1,2,4,5, 7,10,11, 17-21 |
| X | WO 95 32291 A (GENELABS TECH INC) 30 November 1995 see example 6 | 1,2,4,5, 7,10,11, 17-21 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

international application No.

PCT/EP 98/07105

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claim 22 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 98/07105

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0445423 A | 11-09-1991 | AT 128237 T | 15-10-1995 |
| | | AU 638304 B | 24-06-1993 |
| | | AU 6839090 A | 27-06-1991 |
| | | CA 2032907 A | 23-06-1991 |
| | | DE 69022578 D | 26-10-1995 |
| | | DE 69022578 T | 02-05-1996 |
| | | ES 2080099 T | 01-02-1996 |
| | | JP 4253998 A | 09-09-1992 |
| | | US 5308750 A | 03-05-1994 |
| WO 9306247 A | 01-04-1993 | AU 2679492 A | 27-04-1993 |
| | | EP 0642666 A | 15-03-1995 |
| | | JP 6510861 T | 01-12-1994 |
| WO 9306488 A | 01-04-1993 | AU 2683792 A | 27-04-1993 |
| WO 9512677 A | 11-05-1995 | AU 698878 B | 12-11-1998 |
| | | AU 7993294 A | 23-05-1995 |
| | | CA 2175692 A | 11-05-1995 |
| | | EP 0725824 A | 14-08-1996 |
| EP 0468527 A | 29-01-1992 | US 5106726 A | 21-04-1992 |
| | | AU 635124 B | 11-03-1993 |
| | | AU 7439991 A | 17-10-1991 |
| | | AU 646275 B | 17-02-1994 |
| | | CA 2036463 A | 17-08-1991 |
| | | CA 2047792 A | 27-01-1992 |
| | | DE 468527 T | 24-02-1994 |
| | | EP 0442394 A | 21-08-1991 |
| | | ES 2058049 T | 01-11-1994 |
| | | FI 910720 A | 17-08-1991 |
| | | FI 913560 A | 27-01-1992 |
| | | GR 94300008 T | 28-02-1994 |
| | | JP 2763408 B | 11-06-1998 |
| | | JP 5148298 A | 15-06-1993 |
| | | JP 2763215 B | 11-06-1998 |
| | | JP 5222094 A | 31-08-1993 |
| | | KR 9400755 B | 29-01-1994 |
| | | US 5639594 A | 17-06-1997 |
| | | US 5747239 A | 05-05-1998 |
| | | US 5436126 A | 25-07-1995 |
| | | US 5582968 A | 10-12-1996 |
| WO 9604385 A | 15-02-1996 | AU 3382495 A | 04-03-1996 |
| | | BR 9506059 A | 28-10-1997 |
| | | CA 2172273 A | 15-02-1996 |
| | | EP 0721505 A | 17-07-1996 |
| | | JP 9503396 T | 08-04-1997 |
| WO 9302103 A | 04-02-1993 | IT 1249684 B | 09-03-1995 |
| | | AU 2370592 A | 23-02-1993 |
| WO 9425874 A | 10-11-1994 | CN 1122162 A | 08-05-1996 |
| | | JP 8504954 T | 28-05-1996 |
| WO 9532291 A | 30-11-1995 | AU 2594195 A | 18-12-1995 |
| | | AU 684177 B | 04-12-1997 |
| | | AU 2689595 A | 18-12-1995 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/07105

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9532291 A | | CA 2190860 A | 30-11-1995 |
| | | EP 0763114 A | 19-03-1997 |
| | | FI 964605 A | 15-01-1997 |
| | | JP 10503642 T | 07-04-1998 |
| | | NO 964721 A | 17-01-1997 |
| | | NZ 288000 A | 24-09-1998 |
| | | WO 9532292 A | 30-11-1995 |
| | | US 5824507 A | 20-10-1998 |
| | | US 5856134 A | 05-01-1999 |
| | | US 5849532 A | 15-12-1998 |
| | | US 5766840 A | 16-06-1998 |
| | | US 5874563 A | 23-02-1999 |
| | | US 5859230 A | 12-01-1999 |

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW